بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز

رائدة المبيدات الحيوية



أستاذ دكتور

زيدان هندي عبدالحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم

كلية الزراعة - جامعة عين شمس

بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز

رائدة المبيدات الحيوية

أستاذ دكتور

زيدان هندي عبد الحميد

أستاذ كيمياء المبيدات والسموم

كلية الزراعة - جامعة عين شمس

كانزا جروب

بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز
رائدة
المبيدات الحيوية

• الطبعة الثانية ٢٠٠٤ :

كانـــزا جروب

٩ عمارات أعضاء هيئة التدريس بجامعة عين شمس
الدمرداش ـ القاهرة ـ جمهورية مصر العربية
تليفون وفاكس: ٤٨٣٥٥٤٣ ـ ٤٨٥٤٧١١ (٢٠٢)

رقم الإيداع
٢٠٠٣ / ١١٣٥٨

إهــداء

⫽ إلي والدي ووالدتي رحمة الله عليهما.........

⫽ تحية وإعزاز وتقدير إلي زوجتي العزيزة...

أ.د. نجوي محمود محمد حسين

رئيس بحوث معهد بحوث وقاية النباتات

مركز البحوث الزراعية ــ وزارة الزراعــة

الزوجة التي شاركتني مر الحياة وحلوها...... وكانت لي عونا كبيرا ولأسرتي خير راعيا...... مع الدعاء أن يحفظها الله ويرعاها.........

⫽ أبنائي الأعزاء/ **عمرو زيدان ـ أيمن زيدان ـ خالد زيدان**

وفقهم الله... فقد كانوا عوناً وسندا لنا كل الوقت.

⫽ أســاتذتي وزملائــي بكلية الزراعة جامعة عين شمس ــ الجامعات الأخــري ــ مراكــز البحوث والمعاهد البحثية......لما قدموه لي من عون صادق.

⫽ أحفادي/ سلمي أيمن زياد عمرو سليم أيمن

المحتويات

قائمة الجداول

مقدمة الكتاب

* تعاظم الأعلان والأشادة بكفاءة وفاعلية مستحضرات بكتريا "باسيلليس ثورينجينسيز" في مكافحة يرقات حشرات حرشفية الأجنحة خاصة دودة ورق القطن وغيرها فى السنوات الأخـيرة. كذلك بعض السلالات ودورها الفعال في القضاء والسيطرة على يرقات البعوض. كنـت أتعجـب وغيرى من الأساتذة الأفاضل العاملين فى مجال مكافحة الآفات وأتساءل ماذا يمكـن أن تحققــه هذه المستحضرات الحيوية فى ظل تواجد أعداد كبيرة من الآفات حيث أن هــناك قناعة وأتفاق بأن الأتجاهات والأساليب الحديثة فى المكافحة تعمل بكفاءة في ظل تعداد منخفض من الآفات وفى حالة وجود أعداد كبيرة لابد من التدخل بالمبيدات لخفض التعداد ثم الوسيلة الحديثة مما يحقق مكافحة جيدة.

* لقد زادت حرارة الأعلان والترويج لهذه المستحضرات البكتيرية عندما نجح معهد بحـوث الهندسة الزراعية التابع لمركز البحوث الزراعية بوزارة الزراعة في الحصول على سـلالة فعالة من هذه البكتيريا ثم أختبارها وتسجيلها وتداولها تحت الأسم التجارى "أجرين". كانـت حـرارة الترويج تهلل بأن هذا المستحضر شديد الفاعلية على بيض دودة ورق القطن وكان هذا مخالف بشكل ماهو معروف عن كيفية أحداث الفعل لهذه البكتيريا والسموم الداخلية والخارجية التى تفرزها. لقد كان الإستغراب حول إحداث فاعلية وقتل فورى للبيض المعامل ولاتفسير ولادليل ولاحجة مقنعة. لذلك آثرت أن أتناول هذا الموضوع بحياد تام وموضوعية ونظرة علمية بحتة لإلقاء الضوء عن هذه البكتيريا ومستحضراتها مالها وماعليها. لقد تناولت في هذا الكتاب تسعة أبواب أشتملت على الموضوعات التالية:-

- ماهى بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز:
  الخصائص - الوجود الطبيعى - الإنتاج
- تأثيرات بكتريا الباسيلليس على الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة.
- العوامـل البيئـية وعلاقـتها بثـبات وسـمية ونقـل وأنتشار بكتريا الباسيلليس فى المستحضرات الحيوية لمكافحة الآفات.
- المبيد الحيوى باسيلليس ثورينجينسيز وأستخداماته في الدول النامية.
- مخـتارات فـى الدراسات التى أجريت في المعاهد البحثية والجامعات المصرية عن فاعلية وأداء سموم وأحداث الفعل فى بكتريا باسيلليس ثورانجينيسيز.
- التحديات التى تجابه الإنتاج والأستخدامات الخاصة بالبلسيلليس ثورينجينسيز فى الدول النامية.
- إدارة المقاومة لتوكسينات باسيلليس ثورينجينسيز.
- النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز Bt (التقدم والمنظور).
- إنــتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية فى معهد بحوث وقاية النباتات- مركز البحوث الزراعية - مصر.

أرجو أن يوفقنى الله سبحانه وتعالى فى هذا الأتجاه وعلى الله قصد السبيل خدمة للزملاء وأبنائى الطلبة العاملين في مجال الأدارة المتكاملة للآفات فى مصر والوطن العربى الكبير.

أ.د. زيدان هندى عبد الحميد

بسم الله الرحمن الرحيم

الباب الأول

ماهية بكتريا باسيلليس ثورنيجينسيز

الخصائص – الوجود الطبيعى – الأنتاج

مقدمـــة: باســـيلليس ثورنيجينسيز(B.t.) بكتريا ساحرة تنتج عدد من التوكسينات التى تبيد الحشـــرات كما أنها تبدو كمصنع وصناعة كاملة. لقد بدأ الإنتاج التجارى لبكتريا B.t. منذ مايزيد عن ٦٠ عاما ولسنوات عديدة كانت تعتبر مبيد حيوى آمن "Safe biopesticide" ذات ســمية محــدودة للقليل من حشرات حرشفية الأجنحة مع عدم وجود مايدل أو يشير الـــى تأثـــيرات ضـــارة علـــى الثدييات أو الكائنات غير المستهدفة. من الملفت للنظر أن المعلومـــات عـــن هذه البكتريا تقدمت وتطورت بسرعة كبيرة لدرجة أنه كان ومازال يتم تعـــريف ســـلالات جديـــدة وتوكسينات جديدة كل عام لدرجة أنه قد تولد أحساس بالعجز والغمـــوض عـــن كنه وكينونه وماهية ومكونات وآفاق بكتريا الباسيلليس. مع نجاح عزل ســلالات جديـــدة مـــن البكـــتريا B.t. يتم الكشف عن أنشطة وفاعلية ضد مدى واسع من الكائـــنات الحـــية علـــى خـــلاف ماكـــان يعتقده الكثيرين من أن B.t. ذات الأمان العالى متخصصـــة فقط على حشرات حرشفية الأجنحة. جينات توكسينات B.t. تدخل ويعبر عنها فـــى كائنات أخرى وقد أدت التطورات السريعة فى عملية الهندسة الوراثية ونقل الجينات Transgenics الى تغيرات فى المفاهيم العامة والعلمية عن المخاطر والأمان. بالرغم من تعـــاظم وجـــود مجامـــيع كبيرة من العلماء والتطبيقيين تنادى بأحلال البكتريا B.t. محل المبـــيدات الا أنـــه فـــى الوقـــت الراهـــن تسود أقتراحات بضرورة إعادة التأكد من أمان مستحضـــرات هذه البكتريا بسبب عدم توفر كفاية فى تقارير السمية على الثدييات حيث أن مايعنينا فى مكافحة الآفات هو التوكسينات الناتجة من البكتريا.

مـــن الأصدار المثير ذلك الذى نشره Dixon ١٩٩٤ تحت عنوان مثير "ضع عينيك علـــى الباسيلليس ثورينجينسيز" وهو يعطى دليل ومؤشر عن المناخ الجارى والأحتياجات والحـــذر المحـــيط بأســـتخدام المبيدات من الناحيتين الحيوية والكيميائية. فى هذا الأصدار المنشـــور فـــى مجلة البيوتكنولوجى صرح ديكسون بأن B.t. مبيد حيوى آمن ولكنه نادى بضـــرورة الأستكشـــاف عـــن قـــرب للتأثيرات الصحية السالبة. لقد أشار كذلك الى دور

باسيلليس سيريس والباسيلليس غير المرضية فى حدوث مرضية للأنسان حتى لوكانت هناك مجرد فرصة لحدوث المرضية. لقد أشار أيضا الى توفر العديد من الدراسات المرجعية عن السمية على الثدييات أثارت العديد من الأسئلة حول أمان .B.t. مع زيادة أهتمام العامة بأمان .B.t وعزل سلالات جديدة والكشف عن توكسينات جديدة مع عدم وضوح التمييز بين .B.t والنوع القريب منه B. cereus حتمت ضرورة مراجعة أمان .B.t. فى هذا المقام سوف نحاول القاء الضوء عن الأمان البيئى على الثدييات والكائنات غير المستهدفة من .B.t من خلال الأستعراض الوافى للنواحى البيئية والبيولوجية. لقد كان الهدف الرئيسى فى هذا التناول الوقوف على أمان الدلتا. أندوتوكسينات الفعالة على اللافقاريات ولو أن هذا مستحيل تحقيقه وتحديد أمان المركبات الناتجة ومستحضرات B.t. دون الأخذ فى الأعتبار مدى التوكسينات التى تنتج بواسطة السلالات المختلفة من البكتيريا. صور بكتيريا .B.t تمثل أساس مايزيد عن ٩٠% من كل المبيدات الحيوية التى تباع فى الأسواق على مستوى العالم. معظم المركبات خاصة تلك التى تباع فى أسواق الدول المتقدمة مثل أمريكا وأوريا لاتحتوى على البيتااكسوتوكسين للـ .B.t وذلك بسبب سهولة تسجيل مستحضرات الـ .B.t الخالية من التوكسينات الخارجية والتى أثبتت الدراسات التوكسيكولوجية أنها تحدث تأثيرات صحية خطيرة مثل السرطان على الأنسان.

لذلك سوف نركز على أمان الدلتا – أندوتوكسينات خاصة فى نواحى التأثيرات البيئية لخلايا أو جراثيم .B.t والتوكسينات التى تنفرد وتتحرر من هذه الخلايا كذلك تشير الى أستخدام وأمان .B.t المتحولة وراثيا ودورها فى مكافحة الآفات علاوة على الأمان البيئى.

لقد تم أستعراض كم كبير من الأصدارات والنشرات عن .B.t والأمان الخاص بها خلال ٦٠ عاما أو يزيد منذ بداية دخول هذه الوسيلة الحيوية الى النطاق التجارى كمبيد لمكافحة الأفات. لقد أستخدمت .B.t مباشرة فوق المدن ... هل يتصور أحد أيا كان أمكانية السماح بفعل نفس الشئ مع المبيدات مهما كانت درجة الأمان. تجدر ملاحظة أن غالبية الدراسات التى أجريت على .B.t أكثر تخصصا مما هو الحال مع المبيدات الحشرية التقليدية مع سمية منخفضة على الثدييات. هناك نقاط مازالت فى حاجة لمزيد من الدراسة مثل العلاقة بين .B.t و B. cereus خاصة من حيث الأمان لقد قام مؤلفو كتاب "Bacillus thuringiensis: Biology Ecology and safety" وهما Travis R. Glare and Maureen o'callaghan والمنشور بواسطة دار النشر الشهيرة فى إنجلترا

وأمريكا وكندا "John wiley & sons, Ltd" بفحص ومراجعة مايزيد عن ٨٠٠ ملخص وأصدار ونشرات وتقارير غير منشورة. هذا الكم الهائل ليس بالكثير بسبب ضخامة البحوث والدراسات والمشروعات التطبيقية التى شملت .B.t فى العديد من دول العالم كما أن بعض البيانات غير متوفرة كذلك. بالأضافة الى ذلك فأنه بسبب الأهمية التجارية لمستحضرات .B.t تجرى العديد من البحوث الحديثة عن سمية مجاميع جديدة من الكائنات الحية وجينات توكسينية جديدة ومازالت نتائجها دون نشر أو أعلان.

باسيلليس ثورنيجينسيز .B.t بكتريا مكونة للجراثيم قادرة على أنتاج عدد من السموم أو التوكسينات بما فيها الأندوتوكسينات كمبيدات حشرية والتوكسينات الخارجية وليسينات الدم والتوكسينات المعدية. مستوى التنوع بين العزلات داخل النوع عالى حيث أمكن تمييز ٦٠ طرز سير ولوجى ومايزيد عن ١٧٠ جين يشفر الأندوتوكسينات. حساسية العديد من الحشرات لمختلف أنواع التوكسينات أدت الى أستخدام .B.t كمبيدات حيوية. مستحضرات .B.t تمثل أساس مايزيد عن ٩٠% من المبيدات الحيوية الموجودة تجاريا كما سبق القول. سوف نلقى ونركز على توضيح بيولوجية وأيكولوجية .B.t وكذلك الآمان البيئى وعلى الثدييات والكائنات غير المستهدفة للتوكسينات الداخلية المستخدمة كمبيدات حشرية والتى تنتج بواسطة .B.t. سوف نحاول القاء الضوء عن التأثيرات الضارة لتطبيقات .B.t. لقد تم عزل باسيلليس ثورنيجنيسيز لأول مرة عام ١٩٠١ فى اليابان ولكنها أخذت الأسم بعد الكشف الأخير عن البكتيريا التى تقتل فراشات الدقيق فى ثورنجيا بألمانيا. لقد ظهرت فاعلية .B.t كوسيلة مكافحة ضد الحشرات ببطئ حيث أمكن أدخال أول مركب لهذا الغرض فى فرنسا عام ١٩٣٨ ولم تظهر أية أهتمامات فى معظم الدول الأخرى بهذا الوافد الجديد القديم حتى نهاية الخمسينات. لم تتأكد الرابطة بين السمية وجسم الجراثيم حتى الخمسينيات. الآن تشير التقديرات والأحصائيات الى وجود مايزيد عن ٦٠ ألف عزلة من .B.t فى مجموعات عامة وخاصة على أمتداد العالم بما فيها الأهتمام بأستخدامات هذه البكتريا المتميزة.

ماهى الباسيلليس ثورنيجنيسيز (.B.t):

هذا هو السؤال الذى شغل فكر الكثير من الباحثيين الذين يعملون على هذا النوع المميز والمثير من البكتيريا ..B.t بكتريا مكونة للجراثيم ولها فعل إبادى على الحشرات وأحيانا تكون لها تأثيرات سامة عريضة. النوع .B.t يتضمن عدد ضخم من السلالات شديدة التنوع ذات صور عريضة الأختلاف من التوكسينات ومن ثم أنشطة واسعة ضد

مدى كبير في الحشرات وبعض الكائنات الأخرى. لقد تعرضت .B.t لدراسات واسعة عن دورها في البيئة منذ البداية وباستمرار حتى تطويرها كمبيد حيوى متميز فى نهاية القرن العشرين. .B.t تنتج عدد من التوكسينات الأبادية ضد الحشرات في صورة بلورات بروتينية دون أن تكون هى نفسها عالية الفاعلية كممرض للحشرات. هذا النو ع به عدد من تحت الأنواع المميزة والأصناف والطرز والأنواع المرضية. يوجد مايزيد عن ١٧٠ إندوتوكسين – جينات التشفير ومعظمها فعالة ضد الكائنات الحية ولكنها مقسمة فى قليل من الرتب يمكن التعبير عن كل منها من ١– عديد من بين ٨٢ طرز سييرولوجى (جدول ١–١). بالإضافة الى ذلك فأن .B.t تستطيع أنتاج توكسينات أخرى مثل التوكسينات الخارجية exotoxins والهيموليسنات haemolysins والأنتيروتوكسينات entjerotoxins وجميعها لها تأثيرات أبادية على الحشرات وكذلك سمية على الثدييات. يصعب فصل .B.t عن Bacillus cereus من الناحية الوراثية والتى لها تحفظات خاصة بالأمان حيث أن بعض سلالات B. cereus تنتج توكسينات تسبب التهاب الأمعاء والمعدة gastroenteritis في الأنسان.

التعقيد الناتج من أندماج ووجود خليط من البروتينات الأبادية على الحشرات والتى يعبر عنها فى السلالات والتي تعرف من خلال الطرق العديدة البيوكيميائية والوراثية والسيرولوجية وتجهيزها فى صورة سلاسل من المستحضرات خلال دول العالم جعلت من الألمام بكل ماهو مرجعى مثل الـ .B.t من الأمور الصعبة. أستخدام الأسم باسيلليس ثورنيجينسيز لايعطى أى دليل عن نوع التوكسينات أو الخلايا أو الجراثيم أو البللورات أو المستحضرات التى أستخدمت في أى دراسة. لذلك تكونت قناعة لدى مؤلفى هذا الكتاب أن .B.t ماهى إلا تجميع لعزلات فردية وأن المستحضرات المتوفرة فى الوقت الراهن لاتحتوى على جراثيم وبلورات .B.t فقط وأنما تحتوى كذلك على مواد قد تؤثر على السمية. ليكن معلوما أن توصيف الـ .B.t ليس علم على وجه الدقة وأنه في العديد من الحالات لايمكن أرجاع السمية الخاصة لأى شئ وأنما لتحت نوع أو منتج ما.

التسمية Nomenclature :

لقد أصبح موضوع مناقشة ماهية بكتريا .B.t من الأمور الصعبة بسبب السلاسل الطويلة من الأسماء والعديد من التغييرات فى التسمية كما هو وارد فى الدراسات المرجعية. لقد تم تعريف السلالات (الخلايا الكلية) بوسائل متعددة ومختلفة ولكن الطريقة الأكثر شيوعا هى الطريقة السيرولوجية Serotyping بواسطة الأنتيجينات – H تحت المجاميع مثل الطرز السيرولوجية ثم تقسيمها فى الأصل كأصناف Varieties بينما وضع كود تسمية للبكتريا يتطلب تمييز تحت المجاميع هذه كتحت أنواع (Sneath lsubspecies وآخرون ، ١٩٨٦). لذلك فأن ماأطلق عليه قبلا .B. thuringiensis var kurstaki أصبح يعرف الآن B. thuringiensis kurstaki . لقد تم أعادة تقييم جينات التوكسينات مرات عديدة على أنها جينات فردية كما تم تعريف البروتينات السامة. فى البداية كانت تتبع نظم عشوائية لتسمية كل توكسين بواسطة كل مكتشف. فى عام ١٩٨٩ قدم Hofte and whiteley أول تقسيم تصنيفى وتسمية لبروتينات التوكسينات بناء على نشاطها فى أبادة الحشرات. بعد ذلك ظهرت أستثناءات فى التقسيم بسبب تعريف جينات أكثر ذات فعل أبادى على الحشرات. لقد أقترح Crickmore وآخرون (١٩٨٨) نظام جديد للتسمية مبنية على أستخدام عنقود هرمى من تتابع الأحماض الأمينية المعرفة. هذا النظام أستبدل الأرقام الرومانية بالأرقام العربية فى المرتبة الأولى (مثل Cry 1 Aa) وحتى أستخدام أرقام أكبر مع التتابعات الجديدة المتوقعة (سوف نضع نموذج للتسمية فى هذا الكتاب إن شاء الله). مرة أخرى نؤكد أن الدلتا–أندوتوكسين ليست التوكسينات الوحيدة التى تنتج بواسطة سلالات .B.t وتحت النوع. سوف نشير فى هذا الصدد الى الأكسوتوكسينات خاصة البيتا–أكسوتوكسين بالرغم من أنه تم وصف أكثر من نوع واحد. فى النهاية فأن دور الجراثيم والبللورات السامة وغيرها من التوكسينات التى تتداخل أو تعمل بأستقلالية لم تعرف جيدا فى الدراسات ومن ثم فأن الأسم .B.t قد يعنى أى خليط اذا لم يعلن.

نظرة تاريخية: لقد تم وصف .B.t لأول مرة بواسطة Berliner (١٩١١) عندما قام بعزل الباسيلليس من فراشة دقيق البحر المتوسط وقد أطلق عليه بعد ذلك أسم مقاطعة Thuriungia فى المانيا حيث وجدت فى الدقيق المصاب هناك. بالرغم من أنه كان الوصف الأول تحت الأسم ب. ثورنجيسينز الا أنها لم تكن العزلة الأولى. فى عام ١٩٠١ قام البيولوجى اليابانى S.Ishiwata بعزل البكتريا كمسبب للمرض فى ديدان الحرير

وهــو مرض سوتو "Sotto disease" (باسيلليس يحدث الهدم الفجائى) . فى عام ١٩٠٨ أطلق الباحث إيشيوانا الأسم بكتريا الباسيلليس سوتو أيشيواتا وبعد ذلك أتفق على أن الأسم غير صالح وتم التعديل الى باسيلليس ثورينجيسنيز. فى الأصل أعتبرت .B.t ذات مخاطر علــى ديــدان الحرير ومرت عدة حقب تاريخية قبل أن تبدأ البحوث فى أستخدام البكتريا .B.t فــى مكافحــة الحشرات. فى عام ١٩٢٨ بدأت بحوث مكافحة ثاقبة الذرة (أوسترينيا نوبيلالــيس) وأجريت أول معاملة ميدانية بواسطة Husz (١٩٢٩) ضد هذه الآفة. لقد بدأ أول أنــتاج تجــارى فــى فرنسا عام ١٩٣٨ تحت الإسم " سبورين Sporeine (لاميرت وبينرويــن ١٩٩٢). بعد ذلك ولأسباب مختلفة قل الأهتمام فى العقود الزمنية التالية ثم عاد الأهتمام بال .B.t بعد ذلك عن طريق الباحث إدوارو ستنيهاوس" أب فسيولوجيا الحشرات" والــذى حصل على مزرعة عام ١٩٤٢ وأثار الأنتباه الى فاعلية .B.t من خلال دراساته اللاحقة (تانادا وكايا، ١٩٩٣).

لقــد إتضح وظهر وجود جسم جرثومى خارجى فى خلايا .B.t المتجرثمة فى بداية ١٩١٠ بواســطة Berliner وبعدهــا بوقت طويل تم تعريف بعض مواصفات الجرثومة الخارجية تحت الظروف القلوية وليس الظروف الحامضية (Hannay و ١٩٥٣). فى عام ١٩٥٥ أثار هاناى وفيتز-جيمس الى الطبيعة البروتينية للبلورة كما أثار Angus (١٩٥٤، ١٩٥٦) أن بلــورة الجــرثومة الخارجية كانت سبب السمية على ديدان الحرير. لقد حدث فــيض مــن الــبحوث علــى البروتنــيات البللورية للــ .B.t مع دراسة تركيب البللورة والكيمــياء الحــيوية وكيفية أحداث الفعل خلال العشرين سنة التالية (فان فرانكينهيوزين ، ١٩٨٣). لقــد عضــدت ودعمــت بحوث وتطوير بكتريا .B.t بواسطة دلماج وبيجل فى وزارة الزراعة الأمريكية والذين قاما بتجميع كل السلالات الأولى. قام دلماج بعزل سلالة HD-1 والتى تستخدم كسلالة قياسية فى دراسات .B.t بعد ذلك ومازالت تستخدم فى عديد من المنتجات حتى اليوم.

لقد حدث أول إستخدام تجارى للــ .B.t فى أمريكا عام ١٩٥٨. خلال الستينيات تم تطويــر العديــد مــن المستحضرات للتجريب وحقق البعض منها نجاحات. لقد تم تسويق والأتجــار بمركــب ثوريســيد Thuricide والــذى يعــتمد علــىB.t.kurstaki مــع B.t.thuringiensis عــام ١٩٥٧ كمــا قامــت معامل آبوت بنشر مركب الدايبيل.B.t kurstaki, Dipel عــام ١٩٧٠. لقــد حدث أول تسجيل للــ .B.t فى وكالة حماية البيئة الأمريكــية US-EPA عــام ١٩٦١ (Starnes وأخــرون ، ١٩٩٣). فى السبعينات ساد

الأعتقاد بأن .B.t فعالة فقط ضد حشرات حرشفية الأجنحة. بعد ذلك توالت أكتشافات .B.t israelensis الفعالة ضد البعوض والذباب الأسود ثم القيام بعزل B.t. tenebrionis عام ١٩٨٣ الفعالـــة ضـــد بعض حشرات غمدية الأجنحة مما يلقى الضوء على النشاط الواسع لمستحضـــرات .B.t. فـــى الواقع والحقيقة فأن كل سلالة جديدة أظهرت مستوى معين من التخصـــص مما أدى الى الأقتراح بأن .B.t تعتبر نموذجية للسيطرة المتكاملة على الآفات IPM وكذلك الأستخدامات البيئية الحساسة والتى لاينصح بأستخدام المبيدات التقليدية فيها.

لقـــد أســـتمر ومـــازال البحـــث عن سلالات .B.t جديدة ومع تقدم فهم وراثة أنتاج البروتيـــن الســـام ثم الكشف عن توكسينات .B.t غير عادية. فى عام ١٩٩٢ قام لامبرت وبيفرويـــن بـــتقدير أن مايقـــرب من ٤٠ الف عزلة .B.t موجودة فى عينات مجمعه على مستوى العالم ولو أن الباحثان بوسياس وبندلاند (١٩٩٨) قدروا العزلات بحوالى ٦٠ ألف. بالأضـــافة الـــى السلالات الفعالة ضد حشرات حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة وغمدية الأجـــنحة تـــم أكتشـــاف ســـلالات فعالـــة ونشطة ضد غشائية الأجنحة ونصفية الأجنحة والنـــيماتودا والـــبروتوزوا (Rajamohan وآخـــرون، ١٩٩٨). لقـــد أستمرت الزيادة وأضطراد الكشف عن سلالات .B.t والتوكسينات الأبادية ضد الحشرات بمعدل مذهل. لقد أشـــار لامـــبرت وبيفيريون (١٩٩٢) أنتاج أكثر من ٢٥ بروتينات بللورية مختلفة ولكنها مرتـــبطة معـــا بواســـطة بكـــتريا .B.t بيـــنما آخر قائمة موجودة على الأنترنت خاصة بتوكسينات .B.t (Crickmore وآخرون، ١٩٩٩) لحوالى ١٧٠ جينات **cry** و **cyt** أساسا مـــن بكـــتريا .B.t. فـــى عام ١٩٩٨ أشار **Rajamohan** وآخرون الى وجود ٥٨ طرز ســـيرولوجى ممـــيزة بينما يوضح آخر إصدار الى تعريف ٦٩ طرز سيرولوجى مع ١٣ مجموعة أنتيجنية أى بمجموع ٨٢ صنف سيرولوجى (جدول ١-٢).

الأستخدام التجارى لبكتريا Commercial use of B.t.

إســـتخدام منـــتجات .B.t: مستحضـــرات .B.t مـــن أكثر المبيدات الحيوية إستخداما على مستوى العالم حيث تبلغ المبيعات التجارية مايزيد عن ٩٠%. فى عام ١٩٩٠ فأن مبيعات منـــتجات .B.t بلغـــت ١١٠ مليون دولار من إجمالى السوق للمبيدات الحيوية البالغ ١٢٠ ملـــيون دولار (Powell and Jutsum ، ١٩٩٣). يوجـــد مدى واسع من المنتجات متاح ضـــد الآفـــات المخـــتلفة حيـــث تم تسجيل مايزيد عن ١٠٠ منتج تعتمد على عشرة طرز

سيرولوجية (جدول ١-٣). تستخدم B.t. kurstaki بشكل متكرر فى المنتجات التجارية بعض منها مازال يعتمد على سلالة HD-1 من مجموعة دلماج. لقد أستخدم B.t. فى مكافحة عدد من آفات الغابات وحيث أنها تتطلب فى العادة تطبيق بالرش الجوى أو النشر يعتبر B.t. هو المبيد المناسب ليحل محل الكيميائيات التقليدية بسبب التأثيرات على الصحة والأحياء غير المستهدفة. لقد أستخدم B.t. Kurstaki فى مكافحة الفراشة الغجرية (ليمنتاريا ديسبار) ودودة البراعم (كوريستينيورا فوميفيرانا) فى أمريكا الشمالية. خلال الفترة من ١٩٨٠ – ١٩٩٥ أشار ديردون ووانجر (١٩٩٥) ان مايقارب ٧ر١ مليون هكتار عوملت ببكتريا كوريستاكي في شرق أمريكا كجزء من حملة وبرامج خفض تعداد الفراشة الغجرية. لقد أدى الرش الجوى للـ B.t. فى ١٩٩٠– ١٩٩٥ الى استئصال الفراشة الغجرية في جبال Wasatch في يوتا بأمريكا. لقد تم رش مايقرب من ٢٥٠ ألف هكتار فى الفترة ١٩٨٥-١٩٩٤. ببكتريا B.t. Kurstaki لمكافحة الفراشة الغجرية. B.t. واحدة من قليل من المبيدات المسجلة التى تستخدم على نطاق واسع بالرش الجوى فى كندا.

بكتريا B.t. كورستاكي يباع على نطاق واسع فى مكافحة آفات المحاصيل الحقلية والبستانية. كمثال أستخدمت هذه البكتريا فى أستراليا فى صورة منتجات متنوعة ضد مدى عريض من حشرات حرشفية الأجنحة على القطن (Helicoverpa spp.) وفراشة الكرنب وأبو الدقيق الأبيض على زراعات الخضر وبعض حشرات الفاكهة ونباتات الزينة وبعض الآفات الحشرية على ثمار الكيوى والفراولة والدخان. لقد بلغ حجم سوق B.t. فى أستراليا مايكفى لمعاملة ١٠٠ ألف هكتار تمثل حوالى ٥% من السوق الكلي لمبيدات القطن وكذلك ١% من المحاصيل البستانية (١٠-٢٠ الف هكتار). لقد بيعت السلالة B.t. israelensis تجاريا على نطاق واسع فى مكافحة البعوض والذباب الأسود. هناك عدد من المنتجات الناجحة مثل تكنار وفيكتوباك. لقد أستخدمت السلالة الأسرائيلية على نطاق واسع فى حملة مكافحة البعوض والذباب العاض فى أمريكا وألمانيا وفى أفريقيا ضد الناقلات من عائلة Simuliidae التى تنقل مسببات داء المسببات الملتحية. لقد أستخدم عدد من مستحضرات B.t. فى الأتحاد السوفيتى سابقا ضمن المبيدات الحيوية ومنها B.t. caucasicus ضد الفراشة الغجرية والأنواع المرتبطة بها ومستحضرات Bitoksibatsillin ضد خنفساء كلورادو البطاطس(Enterobaktering (B.t.gallariae ضد مايزيد عن ٥٠ نوع من الحشرات. فى روسيا كانت تعامل، مليون هكتار سنويا في

بداية التسعينيات بمستحضرات دندروباسيللين (٨٤٠ الف هكتار) وبيتواكسيباسيللين (٨٢٠ الـف هكتار). لقد أستخدم B.t. tenebrionis فى مكافحة خنفساء كلورادو البطاطس فى أمـريكا وغيرها. B.t. غالبا ماتستخدم فى نظم IPM لأن التخصص العالى للمستحضرات ممـا يقلـل لحد كبير من التأثيرات على الكائنات غير المستهدفة خاصة الأعداء الطبيعية للآفـات الحشـرية. فـى نيوزيلـندا تـم أدخال نظام IPM فى أنتاج ثمار الكيوى يسمى "Kiwigreen" بأدخـال Kurstaki B.t. والزيـت المعدنى مع أستكشاف مشاكل الآفات خاصة الحشرات القشرية المسلحة ولافات الأوراق (Steven وآخرون ، ١٩٩٧).

المعاملة بالنثر فوق الأماكن الحضرية المأهولة بالسكان:

مـن أكـثر الأسـتخدامات المستمرة للـ .B.t المعاملة بالنثر فوق الأماكن المدنية المأهولة بالسكان وعلى وجه العموم فى حملات أستئصال الآفات الغازية بعد الكشف عنها. هـناك ثلاثة أمثلة تتمثل فى أستئصال الفراشة الغجرية الأسيوية فى فانكوفر (١٩٨٨) وفى شـمال كاروليـنا (١٩٩٣) واستئصـال فـراشـة تاسوك ذات البقع البيضاء Orgyia thyellina فـى أركلاندونيوزيلـندا (operation Evergreen، ١٩٩٦). فى هذه الأمثلة الـثلاثة تـم تنظيم أستخدام B.t. Kurstaki كبديل آمن للمبيدات الحشرية الكيميائية والتى كانـت فعالـة بما فيه الكفاية لتحقيق الأستئصال. أهتمام العامة بالأمان أدى الى ضرورة القـيام بأستكشاف بعد الرش على مجموع الناس المعرضون للـ .B.t. فى Brunswick بكـندا أسـتخدمت المبـيدات لمكافحة آفة الغابات Choristoneura fumifera مع ترك مـناطق فاصـلة بمـا يسـمح بالرش الجوى بالإنجراف للمبيدات المختلفة. بكتريا B.t. Kurstaki يجب أن ترش خلال ١٥٥ متر من أماكن سكنى الناس بالمقارنة بمسافة ٣٠٠ مـتر فى حالة المبيدات الكيميائية. فى برامج الأستئصال يتم التعرض المباشر للسكان فى كـل مـرة رش. سـوف نشير الى التأثيرات الصحية للرش الجوى على تعداد السكان فى مواضع أخرى من هذا الكتاب.

جدول (١-١): تقسيم باسيليس ثورينجيسيز تبعا للطرز الوراثي H-serotype

H- Serotype	Serovar	First mention and first valid description
1	Thuringiensis	Berliner 1915: Heimpel & Angus 1958
2	Finitimus	Heimpel & Angus 1958
3a3c	Alesti	Toumanoff & vago 1951: Heimpel & Angus 1958
3a3b3c	Kurstaki	De Bajac & lemille 1970
3a3d	Sumiyoshiensis	Ohba & Aizawa 1989b
3a3d3e	Fukuokaensis	Ohba & Aizawa 1989b
4a4b	Sotto(dendrolimus)	Lshawata 1901: Heimpel & Angus 1958
4a4c	Kenyae	Bonnefoi & de barjac 1963
5a5b	Galeriae	Shvetsova 1959[d];de Barjac & Bonnefoi 1962
5a5c	Canadensis	De barjac & Bonnefoi 1972
6	Entomocidus	Heimpel & Angus 1958
7	Ai = awai	Bonnefoi & de Barjac 1963
8a8b	Morrisoni	Bonnefoi & de Barjac 1963
8a8c	Ostriniae	Ren et al. 1975
8b8d	Nigeriensis	Weiser & prasertphon 1984
9	Tolworthi	Norris 1964: de Barjac & Bonnefoi 1968
10a10b	Darmstadiensis	Krieg et al. 1968
10a10c	Londrino	Arantes unpubl
11a11b	Toumanoffi	Krieg 1969
11a11c	Kyushuensis	Ohba & Aizawa 1979b
12	Thompsoni	De Barjac & Thompson 1970
13	Pakistani	De Barjac et al. 1977
14	Israelensis	De Barjac 1978
15	Dakota	Delucca et al 1979
16	Indiana	Delucca et al 1979
17	Tohokuensis	Ohba et al 1981a
18a18b	Kumanotoensis	Ohba et al 1981b
18a18c	Yasoo	Lee et al 1995a
19	Tochigiensis	Ohba et al 1981a
20a20b	Yunnanesis	Wan-yu et al 1979[d]
20a20c	Pondicheriensis	Rajagopalan et al unpubl
21	Colmeri	Delucca et al 1984
22	Shandongiensis	Wang ying et al 1986d
23	Japonesis	Ohba & Aizawa 1986a
24a24b	Neoleonensis	Rodriguez-padilla & Galan-wong unpubl
24a24c	Novosibirsk	Seleena et al 1995
25	Coreanensis	Lee et al 1994
26	Sito	De barjac & lecader unpubl
27	Mexicannensis	Rodriguez-padilla & galan-wong unpubl
28a28b	Monterrey	Rodriguez-padilla et al unpubl
28a28c	Jegathesan	Seleena et al 1995
29	Amagiensis	Ohba unpubl
30	Medellin	Orduz et al 1992
31	Toguchini	Hodirev unpubl

32	Cameroun	Jacquemard 1990[d] juarez-perez et al 1994
33	Leesis	Lee et al 1994
34	Konkukian	Lee et al 1994
35	Seoulensis	Lee et al 1995[a]
36	Malaysiensis	Ho unpubl
37	Andaluciensis	Aldchis et al 1996
38	Oswaldocrus	Rabinovitch et al 1995
39	Brasihensis	Rabinovitch et al 1995
40	Hua = hongensis	Dia jingyuan al 1996
41	Sonncheon	Lee et al 1995a
42	Jighongiensis	Li rong sen et al in press
43	Guiyaniensis	Li rong sen et al in press
44	Higo	Ohba et al 1995
45	Roskildiensis	Hinrinschen et al unpubl
46	Chanpaisis	Chanpaisaeng unpubl
47	Wratislaviensis	Lonc et al 1997
48	Balearica	Caballero et al unpubl
49	Muju	Seung Hwan park et al unpubl
50	Navarrensis	Caballero et al unpubl
51	Xiaguangiensis	Jain pin yan unpubl
52	Kim	Kim et al unpubl
53	Asturiensis	Aldebis et al 1996
54	Poloniensis	Damgaard et al unpubl
55	Palmanyolensis	Santiago-alvarez unpubl
56	Rongseni	Li rong sen in press
57	Pirenaica	Caballero et al unpubl
58	Argentinensis	Campos-dias et al unpubl
59	Iberica	Caballero et al unpubl
60	Pingluonsis	Li rong sen in press
61	Sylvestriensis	Damgaard unpubl
62	Shaodongensis	Li rong sen in press
63	Bolivia	Ferre-manzanero et al unpubl
64	Azorensis	Santiago-alvarez el al unpubl
65	Pulsiensis	Khalique&khaliqe unpubl
66	Graciosensis	Santiago-alvarez el al unpubl
67	Vazensis	Santiago-alvarez el al unpubl
68	Thailandensis	Chanpaiaeng et al unpubl
69	Pahangi	Seleena and lee unpuble

خصائص بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز Characterization

باسـيلليس ثورنيجينسيز (Bacillaceae) بكتريا موجبة الجرام تكون جراثيم وهى ترتـبط بشكل قريب من العديد من أنواع الباسيلليس الأخرى بما فيها B.cereus. بالرغم مـن أننا نشير اليها بلفظ المفرد .B.t فانه قد أتفق على أن B.thuringiensis عبارة عن

معقد من تحت الأنواع ومعظمها تنتج أجسام بللورية خلال التجرثم. هذه الأجسام البللورية تحـــتوى على الدلتا-أندوتوكسينات D-endotoxins التى تبيد الحشرات والتى جعلت من B.t. مصــــدر ذات قيمة فى السيطرة المتكاملة للآفات الحشرية IPM. لقد أدى التشابه بين B.t. وبكـــتريا B.cereus الى الأهتمام والحدس من أن النوع الأخير يستطيع أنتاج سموم معديـــة فعالـــة على الثدييات entereotoxins والتى تسبب التهابات معدية. كلا النوعين يشـــتركان فـــى الصـــفات الخارجية "الفينولوجية" والبيوكيميائية ولكن B.t. يمكن أن تميز بوجـــود الأجسام البللورية والتى تتكون خلال التجرثم. لقد أدى تحليل الحمض النووى "دنا DNA" والصـــفات البيوكيميائية الى أنه قد يكون B.t. و B. cereus نوع واحد حيث أن الأخـــتلافات بيـــنهما صغيرة جدا وتتركز أساسا فى البلازميد. العديد من دلتا-أندوتوكسين الـــذى يشفر الجينات تنشأ من البلازميد مما يوضح أن هذا الطراز الفينولوجى حساس للفقد وذات قـــدرة على الأنتقال لأنواع قريبة بما فيها B.cereus. لذلك فأن التمييز بين النوعين غـــير واضح وسوف يستمر الوضع التقسيمى محل جدل بين رجال التقسيم. ومع ذلك فأن الحفـــاظ وصـــيانة B.t. كنوع مستقل مازالت ذات أهمية عملية فى تعريف هذه المجموعة الخاصة من البكتريا السامة للحشرات.

التقســـيم السيرولوجى Serotyping من أكثر الطرق المستخدمة شيوعا للتفرقة بين المجامـــيع داخل نوع B.t. ولكن الصنف السيرولوجى Serovar لايرتبط دائما ومباشرة بالنشاط الأبادى على الحشرات. فى الوقت الراهن أمكن تمييز ٨٢ طرز سيرولوجى ولكن لـــم يمكـــن تقسيم كل العزلات بناء على هذه الطريقة. بالأضافة الى ذلك توجد مشاكل فى الـــتفاعل العـــبورى cross reactivity مـــع بعض عزلات B.cereus وهذا يعكس مرة أخرى العلاقة الوطيدة بين النوعان. لقد تطورت طرق تفرقة بديلة لفصل وتعريف سلالات B.t. لقـــد أســـتخدمت طرق جزيئية مختلفة للكشف عن الجينات المسئولة عن السمية فى العـــزلات الفـــردية وفى المستحضرات التجارية التى تحتوى B.t. Kurstaki والتى يمكن تميـــيزها من الأصناف السيرولوجية الأخرى بأستخدام مثل هذه التكنولوجيات الجديدة. هذه الطـــرق قـــادرة كذلك على التفرقة والتمييز بين B.t. و B.cereus على مستوى السلالة (لـــيس كـــنوع) كما أنها تكون وسائل جيدة لدراسة السلوك والمصير البيئى لسلالات B.t. المستخدمة فى مكافحة الآفات.

الســـلالات الفردية لبكتريا B.t. تختلف في عدد وأنواع التوكسينات التى تنتجها. لقد تـــم تعـــريف مايـــزيد عن ١٧٠ جين متخصص لأنتاج الدلتا -اندوتوكسينات. التوكسينات

الداخلـية ترتبط بشكل متخصص مع مواقع المستقبل فى أغشية الخلايا فى المعى الأوسط للحشـرات الحساسـة مما يسبب تثقيب فى الأغشية. قد يؤدى هذا التثقيب إلى فقد السيطرة والتحكم فى تبادل الأيونات بين الخلايا الطلائية وجدار المعدة مؤديا إلى الموت السريع مع الجـرعات العالـية. الجرعات الواطية تؤدى الى خفض حموضة جدار المعدة بما يسمح بإنبات الجراثيم والتضاعف الخضرى السريع والنفاذ فى خلايا الدم وحدوث تعفن كبير فى الدم يتبعه الموت المحتوم. أن دور الجراثيم فى العدوى والموت للحشرات فى الغالب بسيط ولو أنه فى بعض الحالات يمكن للجراثيم أن تنشط فعالية وكفاءة الأندوتوكسينات بدون أن تزيد السمية عما لو أستخدمت منفردة. سلالات .B.t قادرة على أنتاج عدد من التوكسينات بالأضـافة الـى دلتا – أندوتوكسينات. سلالات بعض الأصناف السيرولوجية تنتج البيتا- أكسوتوكسـينات B.exotoxins والـذى يتميز بأن له نشاط أكبر من التوكسينات الدخلية وقـد يكـون له بعـض نواحـى السمية على الثدييات عند الجرعات العالية. لقد ظهر أن سـلالات B.t.. Kurstaki تنتج الهيموليسين haemolysin وهو يماثل الهيموليسين الذى وجـد فـى B. cereus. الهيموليسـينات عـبارة عـن عوامـل العنف الهامة فى بعض الممرضـات البكتيرية فى الفقاريات. بالأضافة الى ذلك وجد أن بعض عزلات .B.t ينتج كميات صغيرة من السموم المعوية المرتبطة ببكتريا B. cereus وهى التى تسبب الأسهال diarrhoel-type ولكن .B.t لاتشترك إجباريا فى ظروف B. cereus فى الأنسان.

معقد باسيلليس سيريس The Bacillus cereus Complex

باسيلليس ثورينجنيسيز (Bacillaceae) بكتريا موجبة لجرام عضوية الشكل تكون جراثـيم. كتيـب أو وجيزبـيرجى Bergey's Manvual للبكـتريا التقسيمية (Sneath وآخـرون ١٩٨٦) يحتوى على قوائم لأنواع .B.T و B. cereus. لقد لوحظ أنه بناء على الأختـبارات الفينولوجـية أقترح لوجان وبيركلى (١٩٤٨) أن .B.tماهى الا تحت نوع البكـتريا B. cereus التقسيم الذى بنى على بيانات تتابع الحامض النووى 16 Sr RNA جمع B. cereus مع B. mycoides و B.anthracis داخل مجموعة B. suB.t. ilis. بيـنما أعتـبرت .B.t هـى البكتريا الأساسية فى إبادة الحشرات فأن الأفراد الآخرين فى المجموعـة تحتوى على سلالات ذات سمية على الثدييات. بعض من سلالات B.cereus تنتج توكسينات تسبب مشاكل جوفمعوية فى الأنسان بينما B.anthracis تنتج مرض حمى

الجمرة الخبيثة فى الثدييات. لذلك فأن التمييز بين هذه الأنواع وبكتريا .B.t ذات أهمية من منظور الأمان على الثدييات.

خـــلال التجرثم تقوم .B.t بإنتاج كلا الجراثيم الداخلية وأجسام البللورية أو الأجسام الجراثـــيم الخارجية parasporal داخل غلاف الجرثومة sporangium . جسم الجرثومة الخـــارجي فـــي الغالب يكون سام لمجموعات خاصة من الحشرات وكذلك يمكن أن توجد العديـــد مـــن البللورات البروتينية المختلفة (دلتا – أندوتوكسينات) ذات الفعل الأبادى على الحشرات في تحت أنواع مختلفة من .B.t وسلالاتها. أن وجود أو غياب الأجسام البللورية هـــو الصفة الرئيسية التى تستخدم للتفرقة بين .B.t وسلالات B.cereus وكلاهما وجدت متوزعة وشائعة بشكل كبير فى التربة. بالرغم من حقيقة أن الجينات التي تشفر البللورات (+ Cry) غالـــبا تنشـــأ مـــن البلازمـــيد plasmid-borne إلا أن ذلك يوضح أن الطرز الفيسنولوجى للـــبللورة حساس للفقد وذات مقدرة على النقل للأنواع الأقارب. لقد إتضح أن نقـــل البلازمـــيد يحدث فى خارج الكائن وهذا قد يزيد من أحتمال الحصول على سلالات Cry^+ لبكـــتريا B. cereus و B.anthracis (جونزالـــيس وآخرون، ١٩٨٢). لقد وجد هـــيلجا ســـون وآخـــرون (١٩٩٨) أن العديـــد من العزلات الطبيعية التى لاتنتج بللورات خارجـــية الجراثـــيم وجـــدت سامة لحشرات حرشفية الأجنحة. لقد أقترح أحتمال أشتراك أندوتوكسين ذائب أو بروتينات تعمل على أبادة النموات الخضرية (VIP's).

العلاقـــة التقسيمية بين أفراد المجموعة غير واضحة وأسباب صغر الأختلافات بين .B.t و B. cereus والـــتى قـــد تكـــون أساسا راجعة لاساس البلازميد. الأجسام المضادة الواطـــية قـــد تنشط عبوريا بين .B.t و B. cereus مما يوضح التجانس الوثيق بين هذه الأنـــواع. لـــم تتمكن الأختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية دائما من التفرقة والتمييز بين الأنـــواع. لقد أقترح كارلسون وآخرون (١٩٩٤) أن .B.t و B. cereus يجب إعتبارهما كنوع واحد بناء على تحليل الحمض النووى دنا فى الكروموسومات وكذلك الفرد الكهربى متعدد المواقع للأنزيم(MEE). أظهرت دراسات تتابعات DNA لمناطق الجين المحفوظة أقتراح أن النوعين قد يكونا سلالات لنوع واحد. لقد أستخدم هليجا سون وآخرون (١٩٩٨) طـــريقة MEE وقـــاموا بفحـــص التنوع الوراثى والعلاقات بين .B.t و B.cereus من المصـــادر الطبيعية. أستنتج البحاث أن هذين النوعين من التربة لهما درجة عالية من الدمج وقليل من القلونة clonality.

التوصيف بواسطة الطرق التقليدية الكلاسيكية : Classical methods

الطرق الفينولوجية Phenothypic methods: التعريف التفريقى للأنواع داخل معقد B. cereus يمثل مشكلة بسبب أن الأنواع تشترك فى العديد من الخصائص الفينولوجية والبيوكيميائية. الطرق المستخدمة تشمل السيرولوجيا السوطية والوصف الخارجى للبللورات (مورفولوجى) والتفاعلات البيوكيميائية وكذلك التقييم الحيوى. هذه الطرق مجهدة جدا مما يجعلها غير قياسية للتفرقة بين جماعات كبيرة من عزلات .B.t. بالرغم من هذه الصعوبة فأن بعض هذه الطرق مستمرة فى الأستخدام لتوصيف وتمييز أنواع .B.t جنبا الى جنب مع الطرق الجزيئية الحديثة المتطورة (Hansen وآخرون و ١٩٩٨). التوصيف البيوكيميائى يبدو من الصعوبة بمكان بسبب حدوث تفاوت فى أستجابات النمو كما أن الخصائص البيوكيميائية لاترتبط دائما بنتائج أختبارات التمييز السيرولوجى. لقد تم تطوير بيئة إختبارية متخصصة لعزل .B.t وبعض من هذه الطرق تساعد فى التمييز والتفرقة بين أنواع الباسيلليس. مثال ذلك تطوير طرق العزل الأولية بما يسمح بعزل جراثيم .B.t من العينات البيئية.

طريقة إنتخاب الخلات acetate selection (مارتن وترافرز ، ١٩٨٩) بنيت على ملاحظة أن جراثيم معظم سلالات .B.t لاتثبت فى وجود تركيزات عالية من منظم الوسط الصوديوم وهذه الصفة عندما تدمج مع البسترة يمكن أستخدامها فى فصل .B.t من السلالات الأخرى المكونة للجراثيم. هذه الطريقة لايبدو أنها تقدم أسترجاع أعلى من الطرق الأخرى الأكثر بساطة. حديثا تمكن الباحثان فاسكونيسيلليس ورابينوفيتش (١٩٩٥) من تطوير بيئة إختبارية لعزل B. cereus من الغذاء والتي يمكن تمييز مستعمرات .B.t و B. cereus فى الغذاء على أساس الخصائص المورفولوجية واللون. لقد أنتقد جولسون وبيسوب (١٩٩٦) عن الأسترجاع الفعال لعزلات .B.t من عينات البيئة بواسطة إستغلال مقاومة .B.t الداخلية لظاهرة البنسلين. إستخدام وحدات التعريف التجارى (VITEX , API) المبنية على الأختبارات البيوكيميائية فشل فى التمييز أو التفرقة بين أنواع الباسيلليس بشكل صحيح (Ibert وآخرون ، ١٩٩٦). أن إيجاد حزمة من الطرق لأسترجاع .B.t من البيئة تعتبر الأقتراب الأفضل للتأكد من التنوع الوراثى. لقد وجد لورانس وآخرون (١٩٩١) صعوبة فى التمييز بين .B.t و B. cereus ، B. anthracis بأستخدام الكشف عن الأحماض الأمينية بالكروماتوجرافى الغازى. على نفس المنوال

أظهـرت الدراسة التى قام بها Zahner وآخرون (١٩٨٩) فى مجال التباين الأنزيمى أن B.t. و B. cereus توضع عزلاتهما فى نوع واحد.

التقسيم تبعا للنوع السيرولوجى: Serotyping

تقسـيم تحت الأنواع أو الأصناف بناء على النوع السيرولوجى بإستخدام الأصناف السيرولوجية – H (الأنواع السيولوجية السوطية) أدت الى تعريف ٦٩ نوع سيرولوجى و ١٣ مجموعـة تحت أنتيجينية مما يعطى أجمالا ٨٢ صنف سيرولوجى (ليكاديت وآخرون، ١٩٩٩). بالـرغم من أن التقسيم السيرولوجى يعكس فقط واحدة من خصائص النوع فإنه من أكثر الطرق الشائعة فى التقسيم على مستوى العالم كما أنه أستقر قياسيا. لقد تم تطوير طـرق سريعة ودقيقة وأقتصادية لتسهيل التقسيم السيرولوجى لسلالات B.t.. بينما التقسيم السيرولوجى السوطى ساعد كثيرا فى العزل بغرض التقسيم الا أن هذا التكنيك له محدودية ونخـص بالذكـر أنه قد ثبت وتأكد عدم عقلانية إستخدام التقسيم السيرولوجى كدليل للتنبؤ عن النشاط الأبادى. مثال ذلك أن (H8 a 8b) يشمل عزلات نشطة ضد حشرات حرشفية وغمدية وثنائية الأجنحة.

هـناك ثلاثـة مشاكل إضافية من الناحية العملية فى التقسيم السيرولوجى بأستخدام الأنتيجنـيات– H. فـى البداية فأن كل السلالات داخل النوع السيرولوجى ليست لها نفس نظـام التوكسـين أو تكاملة. مثال ذلك التوكسين Cry IC الفعال ضد حشرة دودة ورق القطن وجد بشيوع أكثر فى الأنواع السيرولوجية H6 وH7. كذلك وجد أن سلالةH1 وجد بها الجين الذى يشفر هذا التوكسين (ليكاديت وآخرون، ١٩٩٩). ثانيا فأن النشاط العبورى للمصل المضاد للبكتريا B.cereus و B. thuringiensis يخلق صعوبات كبيرة. لقد أثار هذا الباحث ومعاونوه أن ٩٢ من بين ١٩٤ سلالة B. cereus تم إختبارها تكتلت بواسطة المصل المضاد (فى الغالب H ٤، ٥، ١٠، ٦، ٧). لقد إتضح أن عدد التفاعلات العبورية للمضـادات الأنتيجنـية – H بيـن سـلالات B. cereus تـزداد ربما بسبب الزيادة فى الأصـناف السـيرولوجية المعـرفة. بالإضافة الى ذلك فأن حوالى ٣% من عزلات B.t. تتكـتل ذاتيا ولايمكن تقسيمها سيرولوجيا بينما بعض سلالات B.t. ليس لها سوطيات مع أنها قسمت سيرولوجيا (B.t. Wuhanensis).

ممــا يثير التشويق أنه بينما التقسيم السيرولوجى هو الأكثر شيوعا لعمل مجموعات عــزلات .B.t الا أن تحــت الأنــواع تقســم الــى مجاميع بناء على النشاط الأبادى ضد الحشــرات. هذا قد يؤدى الى العديد من تحت الأنواع تتقاسم نفس النوع السيرولوجى مثل B.t.. Gelechidae, B.t. berliner, B.t. thuringiensis. لاتوجــد طرق تعتبر كدليل عن التشابه بشكل عقلانى عند مقارنتها بالعلاقات الوراثية.

الطرق التى تعتمد على الحامض النووى "الدنا" DNA based_ methods

لقــد تــأكد أن طرق التوصيف التى تعتمد على الخصائص الفينولوجية ليست دقيقة للأســتخدام فــى الدراســات الخاصة بالنواحى البيئية والسلوك لبكتريا .B.t بسبب أن هذه الطــرق لاتقــوم تعريف شامل ودقيق وفى الغالب تفشل فى التمييز بين السلالات القريبة الإرتباط. لقد أدى التقدم الحديث فى البيولوجيا الجزيئية الى تطوير الطرق التى تعتمد على DNA قادرة على التفرقة بين الأنواع وفى داخل النوع نفسه. هذه الطرق تتمكن من تمييز السلالات الفردية والعزلات الفردية بما يسمح بمعرفة السلوك البيئى للسلالات التى تستخدم فــى مكافحة الآفات. هذه الطرق يمكن أن تستخدم كذلك فى تعريف وجود أو غياب جينات الأندوتوكســين الخاصــة. هذا يعنى أنه فى الأمكان تقرير مأذا كانت السلالة الخاصة قد فقدت أو أكتسبت جينات دلتا-أندوتوكسين فى البيئة.

طــرق PCR : تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase chain reattion (PCR) من الطرق الجيدة القادرة على السماح بتضاعف التتابعات المستهدفة للدنا ملايين المرات. هذا التكنــيك له إستخدامات متعددة ويمكن يستخدم لتكبير مناطق معروفة فى الحامض النووى "الدنــا" وكذلــك المقارنـــة الوراثية بين العزلات التى لايعرف عنها الا القليل. تستخدم ال PCR الــبادئات Primers وتــتابعات قصيرة من الدنا والتى قد تكون فى نهاية الشريحة الــتى تحــت التكبــير. لقد تم أحداث تتابع للعديد من جينات التوكسين فى بكتريا .B.t كما أســتخدمت طــرق PCR مــع بادئات خاصة ومتخصصة للكشف عن وتوصيف جينات التوكســين فى عزلات .B.t الفردية. لقد أجرى Carozzi وآخرون (١٩٩١) تحليل PCR لــتعريف الدلــتا-أندوتوكسينات المختلفة واشاروا الى تتابع ١٢ بادئ تميز بين ثلاثة أقسام كــبرى مــن جيــنات التوكســين. لقد أستخدم تكنيك التشكل المتعدد المقيد طول الشريحة Restriction fragment length polyymorphism (RFLP) بالدمج والمشاركة مع

PCR فــى تعريف الجينات التوكسينية الجديدة (Kuo and chak، ١٩٦٩). لقد أستخدمت بادئات ذات تجانس مع المناطق المختلفة لتعريف تحت المجاميع داخل عائلة جين Cry.

تفــاعل سلسلة البوليميريز – البادئ الأولى هى (AP-PCR) طريقة بادئ عشوائية تستخدم بادئات صغيرة غير متخصصة لتكبير شرائح الحامض النووى "الدنا DNA" . يتم مقارنة مجموع الشرائح وكلما زاد عدد الحزم بنفس الحجم كلما كان تماثل السلالات أكثر. قد تستخدم الطريقة للتفرقة والتمييز بين المنتجات التجارية المحتوية على B.t. Kurstaki . لقــد أســتخدمت طــرق AP-PCR لتعريف السلالات التجارية لهذه البكتريا بإستخدام الحــامض النووى DNA الكلى من المستعمرات البكتيرية الفردية كصفائح. عندما يستخدم بادئ فردى تكون هذه الطريقة قادرة على أنتاج بصمات "دنا" متميزة تفرق بين ٣٣ صنف ســيرولوجى. لقد أصبح ممكنا التمييز بين B.t. و B.cereus بهذه الطريقة. هذا التكنيك ذات أمكانــية وجودة فى التعريف والتفرقة بين سلالات B.t. ولكنه غير كافى أو دقيق فى الفصل بين B.t. و B.cereus كأنواع.

حامض الرنا الريبوسومى Ribosomal RNA

لقــد قام Priest وآخرون (١٩٩٤) بفحص النظام المقيد لجين الرنا الريبوسومى فى سلالات B.t. وأنواع الباسيلليس المرتبطة بها. لقد طور جيفيك وآخرون، ١٩٩٧ مجسات دنا DNA Probes بناء على المنطقة الرابعة VI region للحامض النووى 16SrRNA لــتعريف B.cereus و B.t.، هذه المجسات عالية التخصص: مجس B.cereus لايعطى إشــارة أو أســتجابة مــع ســلالات B.t. والــذى يختلف فى ثلاثة نيوكليتيدات فقط عن B.cereus بيــنما ســلالات B.t. تكشــف بمجس B.t. فقط. سلالات B.t. المعرفة كلها إيجابيــة الأستجابة مع البادئات التى تستهدف جينات الكراى. هذا بالرغم من أنه لم تقارن ســلالات قياســية دولــية على منطقة VI. لقد أستخدم Dafforchio وآخرون (١٩٩٨). الناســخ الداخلــى للمسافات (ITS) بين جينات الرنا الريبوسومية 16s و 23s كدلائل أو معلومــات جزيئــية فى محاولة للتفرقة بين أنواع الباسيلليس. مع أستخدام خمسة عزلات B.t. فقــط وجد البحاث أن بصمات ITS فشلت فى التفرقة بين B.cereus و mycoides. وB.thuringiensis. بفحــص أقصــر ناســخ ITS بتفصــيل أكــثر أمكن التمييز بين

B.mycoides والنوعين الأخرين بواسطة التحليل المقيد او القاطع restriction بينما لم يمكن فصل B. cereus و B.t..

مـن الناحـية العملية توجد حاجة لدمج أكثر من طريقة. مثال ذلك ماوجده هانسن وآخـرون (١٩٩٨) مـن أن الطـريقة الجزيئـية مـثل تهجيـن المستعمرة -Colony hyberdizadion. كانـت مناسبة للتمييز بين مجموعات كبيرة من البكتيريا. عندما تدمج بـيانات تهجين المستعمرة مع تحليل RAPD (الدنا متعدد الأشكال المكبر عشوائيا) فأنه يمكـن عمـل مجامـيع للعزلات بناء على الكفاءة الوراثية وبصمة الدنا كما أن التوصـيف اللاحق بطرق PCR والطرق الفينولوجية يمكن أن يجرى بشكل أكثر كفاءة.

مقارنة الكروموسومات Comparison of chromosomes

من الأقترابات الحديثة للمقارنة بين عزلات B.t. وتحت الأنواع وكذلكB. cereus عمـل خـريطة للكروموسـومات حيـث يتم مقارنة موضع الجينات المعروفة للعزلات المعروفة. لقد قام لوثجرين وآخرون (١٩٩٨) بمقارنة وضع جينات العنف لسلالات بكتريا B.t. gelechiae B.t. berlinere وB.t. thuringiensis وكلها طرز سيرولوجى I. لقد وجـد الـبحاث أن الطرز B.t. berliner و B.t. gelechiae متماثلة فى موضع الجين ولكن هناك أختلافات لاتمكن من التفرقة أو التمييز كروموسوميا بين B.t. alesti و B.t. Kurstaki مقارنـة الخـرائط الطبيعية للكروموسومات أستخدمت لمقارنة B. cereus و B.t. بأسـتخدام الفـرد الكهـربى فـى مجال (PGFE) وهضم الأنزيم المقيد. لقد وضع كارلسون وكولستو (١٩٩٣) خريطة طبيعية للكروموسومات B.t. بأستخدام الأنزيم المقيد Not 1. مـع فحـص سـلالات B. cereus وB.t. أمكن أستنتاج أن النوعين فى غاية القـرب والأرتـباط. لقـد أوضـح كارلسـون وآخرون (١٩٩٦) أن الخريطة الطبيعية للكروموسـوم سلالة B. cereus متماثلة تماما مع B.t. canadensis. أظهرت دراسات أخرى إعتمدت على طرق MEE, PFGE أن النوعين متداخلان مع بعضهما.

التوكسينات Toxins:

مـن المعـروف أن سـلالات B.t. تنتج عدد من التوكسينات المختلفة بعضها ذات مخاطـر صحية. لذلك فأن أعتبار الأمان والتأثيرات غير المستهدفة لمختلف أصناف B.t. تتطلـب فهـم العديد من التوكسينات المختلفة الناتجة بواسطة البكتريا داخل النوع أو بين

الأنـــواع. التوكســـينات التى تنتج بواسطة بكتريا .B.t تشمل دلتا-أندوتوكسينات التى لها نشـــاط أبـــادى ضـــد الحشـــرات والأكسوتوكسينات التى قد يكون لها تأثيرات سامة على الثديـــيات مـــع الجرعات العالية والهيموليسينات والتوكسينات المعويـــــة (من النوع الذى يســـبب الأسهال). التوكسينات المعوية فى B. cereus مسئولة عن التسمم الغذائى وبكتريا .B.t تستطيع أنتاج توكسينات مماثلة. سوف نناقش فى موضع لاحق التأثيرات التى تحدثها التوكسينات المختلفة على الكائنات غير المستهدفة خاصة الثدييات.

الأنزيمات والتوكسينات الخارجية Exoenzymes and exotoxins

البيـــتا-اكسوتوكســـين Beta-exotoxin: البيـــتا- أكسوتوكســـين (يطلـــق علـــيه كذلك ثورنيجنيســـيز ، التوكسين الثابت حراريا، توكسين الذباب) تم الكشف عنه فى سلالات من عديـــد مـــن تحـــت الأنـــواع (جدول ١-٢). هذا التوكسين قليل الوزن الجزئيى ثابت ضد الحـــرارة (٧٠°م لمـــدة ١٥ دقـــيقة) كما أنه له مدى واسع من النشاط والفاعلية حيث تقتل مخـــتلف حشـــرات حرشـــفية الأجنحة وثنائية وغشائية ونصفية ومستقيمة الأجنحة وكذلك النـــيماتودا والأكـــاروس البيـــتا – أندوتوكســـين أكـــثر ســـمية عـــندما تعـــامل لا معويا Parenterally عمـــا هـــو الحـــال مع التناول مع الغذاء لأنها لن تمر خلال جدار المعدة وتـــنهار بواســـطة أنـــزيمات فوسفاتيزيس المعدة (Sebesta وآخرون ١٩٨١). النوع I أكسوتوكســـين تم الكشف عنه فى السلالات من الطرز السيرولوجية .B.t ١، ٩، ١٠ بينما البيتا-أوكس توكسين الثانى النوع I تم عزله من الطرز السيرولوجى -B.t. morrisoni 8ab (Levinson وآخـــرون ، ١٩٩٠). لقـــد وجـــد البحاث أن البيتا-أكسوتوكسين تشفر بواســـطة دلتا-أندوتوكسين كراى – التى تشفر البلازميد فى خمسة سلالات تم فحصها فى حالة واحدة على الأقل يكون البلازميد سهل النقل بواسطة النظام الطبيعى للنقل الأرتباطى الموجود فى .B.t.

بينما ينكسر الأكسوتوكسين ويفقد نشاطه فى القناة الهضمية للحشرات يبدو أن معظم الحشـــرات حساســـة أذا اســـتخدمت جـــرعة عالية بما فيه الكفاية. الحشرات التى تعامل بالأكسوتوكسين تقف عن التغذية وتموت خلال عدة أيام من التعرض. البيتا- أكسوتوكسين يمكـــن أن تسبب تأثيرات تشويهية خلقية وتحدث خلل فى أنسلاخ اليرقات أو العذارى. لقد وجـــد أنه مع الأكاروسات يكون للأوكسوتوكسينات فعل مورفولوجى وراثى أو تأثير على

الغـدد المسـئولة عـن الـتغذية Gonadotropic مشـابهه لمـا يحدث مع مشابهات الهورمونات Juvenoids (Petrova ، ١٩٨٧). الحشرات البالغة التى تعيش بعد المعاملة بالبيـتا أكسـو توكسين قد تنقص فترة الحياة وتخفض من الكفاءة التناسلية. السم الخارجى لبكتريا B.t. tolworthi سبب تأثيرات غير قاتلة علي ذباب اللوسيليا على صورة تداخل فـى أنسـلاخ اليرقات بينما أحدث نقص فى أنزيمات الهضم فى يرقات دودة ورق القطن. بالـنظر الـى الأمان على الكائنات غير المستهدفة نشير الى حقيقة أن السم الخارجى بيئيا يمكـن أن ينشـط الدلتا-أندوتوكسين ضد الحشرات ذات المقاومة الطبيعية. هذا التنشيط قد ينتج من التأثير التثبيطى للبيتا-أكسوتوكسين على إعادة خلق خلايا المعدة الوسطى التالفة.

التوكسـين الخارجى قادر على عبور أغشية الخلية والنواة فى أجهزة الثدييات ومن ثـم فـأن تعرض الفقاريات للبيتا-أكسوتوكسين تؤدى الى تكوين مواضع ضرر فى الكبد والكلـى والغـدد الأدرينالية. البيتا-أكسوتوكسين عندما يعامل على الدواجن يؤدى الى فقد النشـاط وأنـتاج بيض ذات حجوم صغيرة. لقد قام Meretoja وآخرون (١٩٧٧) بفحص السـمية الطفـرية للسـم الخارجى لبكتريا B.t. فى النظم المختلفة للثدييات. لقد وجد فى مزارع للدم الآدمى أن التركيزات عالية السمية جدا من الأكسوتوكسين تزيد من التشوهات الكروموسومية بشكل معنوى.

بسـبب السـمية على الفقاريات فأن معظم التجهيزات التجارية للـ B.t. تتكون من تحـت أنواع أو عزلات لاتنتج البيتا-أكسوتوكسين. كما هو الحال مع تسجيل المبيدات كى تستخدم على الغذاء فى أمريكا فأن المواد الفعالة فى بكتريا B.t. يجب أن تختبر للتأكد من عـدم وجود البيتا-أكسوتوكسين (Mc Clintork وآخرون ١٩٩٥). طرق التفرقة أعتمادا على وجود السم الخارجى تعتمد أساسا وفى الأصل على وقت الأستهلاك والتحليل الحيوى الصـعب علـى الفراشات يوجد العديد من المعامل فى الوقت الراهن قادرة على أستخدام الكروماتوجرافى السائل فائق المقدرة (HPLC) للكشف الكمى عن البيتا-أكسىتوكسين فى البيرة المتخمرة وعينات المستحضرات.

لقـد كـان يعـتقد فى البداية أن أنتاج السم الخارجى محدودا أو قاصرا على بعض الطـرز السيرولوجية السوطية حتى مع التسليم بأن التحول والأرتباط يمكن أن يحدث بين الطرز السيرولوجية. من الناحية التاريخية فأن الطراز السيرولوجى أستخدم ببساطة للتنبؤ بوجـود أو غـياب التوكسين الخارجى. مثال ذلك أنه لم توجد أية تقارير تشير الى أنتاج التوكسـينات الخارجـية من B.Kurstaki حتى أعلن Ohba وآخرون (٢-١٩٨١) عن

عــزل توكســين خارجي بواسطة سلالة الباسيلليس كورستاكى. لقد قام ليفنسون وآخرون (١٩٩٠) بأختــبار نوع سلالات عشرة من الطرز السيرولوجية لأنتاج التوكسين الخارجى ووجدوا أن الطرز السيرولوجية ١،٩، ١٠ كانت من المنتجات للأكسوتوكسين من النوع I بيــنما الطــرز السيرولوجى Bab ينتج الأكسوتوكسين من النوع الثانى II. السلالات التى تنــتج التوكسين الخارجي وجدت كذلك فى العديد من الأنواع السيرولوجية الأخرى (جدول ١-٢). حيــث أن الســلالات المنتجة للتوكسين الخارجى مازالت غير معروفة للعديد من الطــرز الســيرولوجية فــأن أنتاج التوكسين الخارجى يختلف بشكل كبير فيما بين الطرز الســيرولوجية. التصنيف السيرولوجى وحدة غير كافى للتنبؤ عما أذا كانت السلالة منتجة للتوكســينات الخارجية. لقد تم وصف مجموعة جديدة من التوكسينات الخارجية من بكتريا B.t. israelensis بواســطة lueiser وآخرون ، (١٩٩٢) وHorak وآخرون (١٩٩٦). لقــد وجــدوا نشــاط وفاعلية لنواتج التمثيل الذائبة فى الماء وسم البكتيريا الأسرائيلية ضد القواقــع المائــية والديدان الشريطية. لقد وجد أن التوكسين الفعال ينتمى لنفس قسم البيتا – أكسوتوكسين وليس له سمية على الثدييات.

الهيموليسينات Haemolysins :

الهيموليســينات أو ليســينات الــدم تعمل على تحليل كرات الدم فى الفقاريات وهى عوامــل هامــة للعنفوانية فى العديد من الممرضات البكتيرية للفقاريات ويعتقد أنها عوامل هامة بوجه عام لأحداث الأمراض الجهازية فى الأنسان. لقد وجد أن الهيموليسينات المنقاة من B.t. Kurstaki تماثل تماما هيموليسينات B. cereus (ماتسوياما وآخرون، ١٩٩٥).

<u>التوكسينات المعوية</u> Enterotoxins:

لقــد وجد أن عزلات B.t. تنتج التوكسينات الداخلية من النوع المسبب للأسهال فى B. cereus (كارلســون وآخرون ١٩٩٤، عبد الحميد ولاندن ١٩٩٤).التوكسينات المعوية للباســيلليس سيريس مسئولة عن أعراض التسمم الغذائى بعد تناول هذه البكتريا. لقد وجد عــبد الحميد ولاندن (١٩٩٤) أن ٢٣ عزلة B.t. من بين ٤٠ جمعت من التربة فى السويد (عرفــت ثورنيجنيسيز ، كورستاكى) جاليرى، ويندروليمس، دارماستدينسيز، أسرائيليئيز) تنتج السم الداخلى المعوى المسبب للأسهال. يتم الكشف عن هذا التوكسين الدخلى بأستخدام

وحـــدات التكـــتل السالب المعكوس Bc Et- RPLA التى تنتج بواسطة Oxoid. لقد قام Damgaard وآخــرون (١٩٩٦-أ) بعزل توكسينات معوية والسلالات التى تنتجها B.t. مـــن الأطعمة. لقد تم فحص السلالات لمعرفة تأثيراتها الخلوية السامة Cytotoxic كدليل للنشاط كسم معوى.

الأنزيمات الخارجية Exoenzymes:

بكـــتريا B.t. تنـــتج عـــدد مـــن الأنزيمات الخارجية التى تلعب دورا فى مرضية الحشـــرات. مثال ذلك أنفراد وأطلاق أنزيمات الكيتينيز والبروتييز والتى يعتقد أنها تحدث خلـــل فـــى الغشاء المعدى مما يحقق زيادة فى الغشاء الطلائى للمعدة. لقد تم الكشف عن تضـــمين أثـــنان من أنزيمات الفوسفوتيز ليبيزيس فى عنفوانية عزلة B. gelechiat رقم ١٣ والـــتى تعـــانى مـــن نقص البللورات ولكنها تحتفظ بالعنفوانية عندما تحقن فى يرقات الحشرات.

البروتينات الخضرية كمبيدات حشرية Vegetative insecticidal protein

حديـــثا أمكـــن عـــزل قسم جديد من التوكسينات الأبادية للحشرات وهى البروتينات الخضـــرية كمبـــيدات حشـــرية (VIPs) من بكتريا الباسيلليس B.t.. ألمركب Vip 3A بروتيـــن جديد ذات نشاط عريض ضد حشرات حرشفية الأجنحة عرف لأول مرة بواسطة الباحـــث Estruch وآخرون، (١٩٩٦). لقد ظهرت فاعليته ضد الدودة القارضة السوداء، دودة ورق القطـــن ودودة البنجر ودودة براعم الدخان ودودة اللوز الأمريكية ودودة كيزان الـــذرة. لقـــد وجـــد أن ١٥% مـــن سلالات B.t. التى فحصت فيها سلاسل متجانسة من البروتين Vip 3. البروتينات ذات ٧٩١ حمض أميني والتى أمكن التنبؤ بوجودها لاتحتوى علـــى سلاسل معروفة من البروتينات ولكنها تظهر فى مرحلة النمو الخضرى (Estruch وآخـــرون، ١٩٩٦). لقـــد إختلفـــت حساســـية الحشرات المختلفة لهذه البروتينات. الخلايا الطلائـــية فـــى معـــدة الحشرات الحساسة تمثل الهدف الأول للبروتين الأبادى Vip 3A ومايســـتتبع ذلك من تحلل تمثل الميكانيكية الأولية للموت (Tu وآخرون ١٩٩٧-١). حتى الآن لم يتم تحديد أهمية بروتين VIPs فى السمية.

دلتا أندوتوكسين :Delta – Endotoxins

عند التجرثم فإن غالبية سلالات .B.t تنتج أجسام بللورية تحتوى على دلتا – أندوتوكسين ذات الصفات الأبادية ضد الحشرات. البروتين البللورى يمثل ٢٠-٣٠% من البروتين البكتيرى الكلى عند التجرثم (Boucins and pendland، ١٩٩٨). تتكون الأجسام البللورية من توكسينات أولية وحيدة monomeric protoxins. إنهيار الأجسام المضادة بواسطة الأنزيمات المحللة تنتج بروتينات سامة أصغر (دلتا–أندوتوكسينات). هذا السلوك يختلف فيما بين السلالات ولكن فى معظم الحالات فأن سلالات .B.t تنتج أجسام تحتوى على خليط من دلتا –أندوتوكسينات. مثال ذلك أن بكتريا B.t. Kurstaki HD-1 تحتوى على ثلاثة (Cry 1 (130 Kda وأثنان (Cry 2 (70 Kda للأندوتوكسينات فى نفس البللورة. هناك سلالات .B.t أخرى تحتوى القليل من دلتا – أندوتوكسينات كما فى حالة .tenebrionis B.t. هذه التوكسينات الداخلية والتى تختلف فى نشاطها تجاه الحشرات تكون أجسام بروتينية. لقد تم تعريف مايزيد عن ١٧٠ جين مختلف تشفر دلتا – أندوتوكسينات. نشاط وكفاءة دلتا – أندوتوكسين محصور فى القناة الهضمية.

العديد من جينات السمية للـ .B.t بما فيها بعض التوكسينات الخارجية تشفر بالدنا الكروموسومى الأكسترا على بلازميدات ذات أحجام متفاوتة وأعداد مختلفة لكل خلية. فى العادة فأن جينات التوكسينات تقع على البلازميدات الكبيرة (40-150 Mda) وقد إتضح وجود أكثر من جين توكسين واحد على الأهليج كما فى البكتريا .B.t الأسرائيلية فيها أربعة جينات توكسينية على نفس البلازميد 72 Mda (Lereclus وآخرون ، ١٩٩٣). ليست كل جينات الأندوتوكسين للـ .B.t تقع على البلازميدات حيث أن بعضها يقع على الكروموسومات ولو أن وجود الميجا ـ بلازميدات لايمكن تجاهله. لقد وجد Carlson and Kolsto (١٩٩٣) أن التوكسين من النوع Cry IA يوجد على الكروموسوم فى أربعة سلالات وكانت خارج الكروموسومات فى أربعة سلالات وكانت على الكروموسومات وخارجها فى سلالتان منها.

بالإضافة الى إنتاج توكسينات كراى Cry فأن العديد من سلالات .B.t تنتج كذلك أندوتوكسينات أصغر ذات تأثيرات خلوية Cytolytic. 25-28 Kda هذه الأندوتوكسينات تشمل توكسينات Cyt IA من الباسيلليس الأسرائيلية و B.t. morrisoni (PG-14) و yt 2A من B.t.kyushuensis. على عكس الكراى دلتا –أندوتوكسينات وكذلك

الأندوتوكســينات Cyt تستقر مع الدلتا – كراى – أندوتوكسينات فى جسم البللورة لقد كان الأندوتوكسين Cyt 1 A من الباسيلليس الأسرائيلية أول الأندوتوكسينات الخلوية Cyt التى تــم توصـــيفها. البللورات التى تذاب تحت الظروف القلوية تفرد توكسينات أولية يمكن أن تنشــط بواسطة الأنزيمات المحللة للبروتينات فى الجهاز الهضمى. لقد وجد أن التوكسينات Cyt 1A المذابــة تحلــل خلايـــا الدم وخلايا أجسام الحشرات أما التوكسينات غير المذابة لاتحقق هذا النشاط.

أظهـــر الفحـــص بالميكروســكوب الضوئى أو الألكترونى أن البللورات لها أشكال مخــتلفة تــم وصـــفها. لقــد ثبت أن البللورات ثنائية الهرمية ترتبط بالنشاط ضد حشرات حرشــفية الأجنحة بينما البللورات البيضاوية أو المكعبات فعالة ضد كلا حشرات حرشفية وثنائــية الأجنحة. تاريخيا وجد الدلتا ـــ أندوتوكسينات المتخصصة (بروتينات الكراى) مع أجســام مضـــادة ـــ تضـــاد الكراى وحديثا أمكن أستخدام الطرق الجزيئية لأستيضاح هذا الأمر. لقد تم الأعلان عن أول تتابعات جينية لبلورات البروتين عام (١٩٨٥) ومع تحسين طـــرق عـــزل الحـــامض الـــنووى الدنـــا وبكتريا B.t. تم تعريف عدد مميز من جينات التوكسينات وتتابعاتها. تحت مظلة نظام التسمية الأول كانت توكسينات كراى I فعالة ضد حشـــرات حرشفية الأجنحة، كراى II ضد حرشفية وثنائية الأجنحة، كراى III ضد غمدية الأجـــنحة، كراى VI ضد ثنائية الأجنحة مع وجود بعض الأستثناءات داخل المجاميع. لقد ظهـــرت مجموعة كراى خامسة فعالة ضد غمدية وحرشفية الأجنحة والتوكسين يقسم الآن علـــى أنـــه Cry IIa وهـــناك آخر Cry II b. هناك (Cry 5 As) فعال ضد النيماتودا. سوف نعاود التسمية والتعديلات التى أجريت على التسميات الأولى فى مواضع أخرى من هذا الكتاب أن شاء الله تعالى.

جدول (١-٢): التوكسينات المختلفة التى تنتج بواسطة سلالات الباسيلليس ثورينجنيسيز (مأخوذة من Krieg and Langenbruch، ١٩٨١)

Serovar	H-serotype	B-exotoxin	B. cereus type enterotoxin[1]	Haemolysin
Thuringiensis	1	+ (or 0)		+
Finitimus	2	0 [b]		
Alesti	3a	0		
Kurstaki	3a,3b	0 (or + [c,d,e])		+
Sotto	4a,4b	0	+(or +[f])	
Dendrolimus	4a,4b	0 (or + [f])		+
Kenyae	4a,4c	+ (or 0)		
Galleriae	5a,5b	0 (or + f.g.h)		+
Canadensis	5a,5c			
Entomocidus	6	0		
Ai = awai	7	0		
Morrisoni	8a,8b	0 (or +[e])		
Ostriniae	8a,8c	+[e] (or 0)		
Tolworthi	9	0		
Darmtadinsis	10	+ (or 0)		
Toumanoffi	11a,11b	+ (or 0)		+
Kyushuensis	11a,11c	0		
Thompsoni	12	0 (or +[l])		
Pakistani	13	0		
Israelensis	14	0[j] (or +[d.k])	+	+
Indiana	16	+[h]		
Kumanotoens	18a,18b	+ (or 0)		
Tochigiensis	19	0		
Japonensis	23	0		
Medellin	30	0		
Wuhanensis	- [a]	+		

كيفية أحداث الفعل Mode of action :

دلتا – أندوتوكسينات delta- Endotoxins

إستهلاك الغذاء المعامل بالأندوتوكسينات يؤدى فى العادة الى توقف يرقات حشرات حرشفية الأجنحة عن الأكل وحدوث شلل فى المعدة يؤخر مرور المادة النباتية المهضومة مع السماح للجراثيم بالإنبات واضطراد النمو الخضرى. اليرقات التى تأكل غذاء به جرعات عالية من التوكسين تعانى من شلل عام يعقبه الوفاة. أوضحت الدراسات النسيجية "الهستولوجية" أن التوكسينات التى تنفرد من الأجسام البروتينية والتى تنشط من خلال تحلل البروتينات فى غشاء المعدة ترتبط بمواقع مستقبلات خاصة على أغشية الخلايا العمادية للمعى الوسط مما يحدث ثقوب تتداخل مع نظم الأنتقال الأيونى عبر جدار المعدة الوسطى. مع الجرعات العالية من التوكسينات يحدث تحلل للخلايا الطلائية للمعدة الوسطى مما يؤدى الى حدوث موت سريع. الجرعات الواطية أو مع الحشرات الأقل حساسية فأن تلف خلايا المعدة يكون كافيا لأيقاف الأفرازات العادية فى المعدة والتى تخفض من حموضة الجدار وتسمح للجراثيم بالأنبات. حينئذ تنفذ الخلايا الخضرية وتتضاعف فى بيئة الهيمولمف الغنية مما يسبب تلف خلايا الدم والوفاة. يرقات البعوض المعاملة ببكتريا الباسيلليس الأسرائيلية عادة تؤدى الى توقف الأكل خلال ساعة من المعاملة وبعد ذلك يقل النشاط خلال ساعتان ثم كسل تام بعد أربع ساعات يعقبه شلل عام بعد ٦ ساعات من تناول الغذاء المعامل. معظم عزلات .B.t ليس لها التأثير السريع كما هو الحال مع البكتريا الأسرائيلية. تثبيط التغذية يمكن أن تحدث بعد الأكل مباشرة لجراثيم .B.t والتوكسينات بينما فى اليرقات والخنافس يحدث الموت بسرعة (١–٢ يوم) مع اليرقات الحديثة بينما يستغرق حدوث الموت فترة أطول قد تصل لأسبوع مع اليرقات الكبيرة. الحشرات التى تعامل بتركيزات تحت مميتة من .B.t قد تشفى خلال يوم أو يومان من التعرض. لقد تم تسجيل عدد من التأثيرات غير المميتة فى أماكن كثيرة.

تخصص المستقبلات على النسيج الطلائى للمعدة ذات أهمية كبيرة ، تحديد النشاط الأبادى ضد الحشرات. الدراسات التى أستخدمت فيها مجسات المناعة الكيميائية أظهرت أن توكسينات Cry و Cyt ترتبط مع جدار خلايا المعدة الوسطى. أظهرت تحليلات الأرتباط خارج الجسم الى وجود مواقع أرتباط عالية التخصص على الأغشية. فى حالات عديدة وجد الإرتباط مع هذه المواقع يرتبط بحساسية الحشرات.

إســـهام الجراثـــيم فى أحداث السمية: دور جراثيم B.t. فى إحداث السمية والعدوى ظلت مـــثار جـــدل لفـــترة طويلة. لقد أشار Navon، (١٩٩٣)أنه مع معظم الحشرات حرشفية الأجـــنحة يكـــون البروتيـــن البللورى هو المسبب الأكبر للموت بينما الجراثيم تلعب الدور الأقل. لقد عضد عزل وأستخدم توكسينات الكراى هذا القول. بينما يكون ذلك وضع حقيقى فـــى العديـــد مـــن الأرتباط الخاص بأنواع وتحت أنواع أو سلالات B.t. توجد العديد من الـــتقارير تشـــير الـــى أن الجراثيم تنشط نشاط التوكسين أو تسبب الموت مباشرة. نشاط التوكســـينات المغطاة من B.t. كورستاكى تزيد ١٤٦ مرة عند إضافة الجراثيم الخالية من التوكســـين ضد حشرة Plutella xylostella. على نفس المنوال أشار Mc Gaughey، (١٩٩٦) أن أضـــافة الجراثيم نشطت كفاءة الدلتا – أندوتوكسين ضد يرقات فراشة الدقيق الهندى.

فـــى العديد من البحوث والدراسات أستخدمت الطرق الطبيعية لأستخلاص الجراثيم من مستحضرات البللورات النقية والعكس صحيح. الشوائب التى تصل نسبتها ١% أو أقل فـــيما يطلـــق علـــيه المستحضـــرات النقية غالبا ماتؤثر على هذه النتائج. لقد أستخدم أسا وآخـــرون (١٩٨٧) مستحضـــرات عالية النقاوة جدا تحصل عليها من قتل الجراثيم بأشعة جاما وكذلك جراثيم خالية من الأندوتوكسين فى أغلفتها (تحصل عليها من طفرة خالية من الـــبللورات). لقد أثار البحاث أن الجراثيم النقية أو بلورات B. aizawai كانت غير فعالة ضد يرقات دودة الشمع حيث كان التركيز النصفى القاتل ١٠^١٠^ بلورات رحم غذاء. إضافة ٠٠١و% جراثـــيم للبللورات تؤدى إلى موت ٣٦% فى اليرقات بينما ٠١و% جراثيم تقتل ٦٤% يـــرقات أمـــا LC50 لمخلوط بنسبة ١:١ كانت ٧ر٤ × ١٠^٦^ جراثيم وبللورات/جم غذاء.

فـــى يـــرقات الفراشة الغجرية وجد Dubois and Dean (١٩٩٥) أن الجراثيم أو الخلايا الخضرية لعدد من سلالات البكتريا تزيد بشكل معنوى من سمية Cry 1Aa و Cry 1 Ac البروتينـــية البللورية المبيدة للحشرات بما فيها الجراثيم من B. cereus. لقد وجد مع B.megaterium و B. subilis انه لا الجراثيم ولا الخلية سامة لوحدها. لقد أظهرت الدراســـات مع B.t. kurstaki وجد أن إضافة القليل من الجراثيم إلى تركيزات منخفضة مـــن التوكســـينات زادت بشـــكل معنوى من نسبة الموت على الفراشة الغجرية من جراء التسمم الدموى كما أن الجراثيم وحدها ليست مرضية.

التأثـير المنشـط للجراثـيم على السمية للباسيلليس .B.t قد تسببت جزئيا بواسطة التوكسـين المضـاف أو الأضافى فى غلاف الجرثومة ولكن يستحب القول بأنه ينتج من الـنمو الغـامق للخلايـا الخضرية من الجراثيم المهضومة. الجراثيم يمكن أن تنبت عندما تـنخفض درجـة حموضة معدة الحشرة ومن ثم تفقد من جراء المعدة وتسبب تسمم الدم. أتساءل كيف لهذه البكتريا أن تؤثر على بيض دودة ورق القطن؟.

التأثيرات غير القاتلة : Sublethal effects

التأثـير على الكائنات غير المستهدفة عادة يؤخذ من وجهة نظر الوفيات ومع ذلك فـأن التأثيرات غير القاتلة والتى يصعب الكشف عنها بسهولة كما فى حالة الموت تحدث بالتأكـيد. لقد ظهرت تقارير عديدة للتأثيرات غير المميتة لمستحضرات بكتريا .B.t. هناك تأثـير الباسيلليس كورستاكى على حشرات حرشفية الأجنحة بما فيها تأخير النمو والتطور ونقـص فى وزن اليرقات والعذارى وحجمها وخفض فى التعذر وخروج الحشرات الكاملة وكذلـك الـنقص العرضى فى الكفاءة التناسلية للحشرات الكاملة. لقد إتضح أن الجرعات غـير القاتلـة للباسـيلليس جاليرى عندما تؤكل بواسطة يرقات الدودة القارضة الى تأخير تطـور العـذارى وخفض أنتاج البيض وخفض النسبة المئوية لخروج الفراشات وخصوبة البيض وطول فترة حياة الحشرة الكاملة وخفض وزن العذارى وأحداث تشوه فى العذارى والحشرات الكاملة. قد تمتد التأثيرات خلال الجيل الثانى وقد يزداد طول فترة الجيل.

السلوك الغذائى فى بعض الحشرات قد تأثر من جراء التعرض لكميات غير قاتلة من .B.t

الحدوث الطبيعى ودور الباسيلليس فى البيئة:

الباسـيلليس ثورينجينسـيز تحـدث طبيعـيا وبشكل كلى فى البيئة فهى تعتبر من المكونـات الشائعة للكائنات الدقيقة فى التربة وقد تم عزلها من معظم أوساط المعيشة. لقد تـم عـزل .B.t من عدد من الحشرات ولم تشير أية تقارير لكونها تسبب أمراض وبائية epizootics خـارج المـزارع الحشرية فى المعمل. دور بكتريا .B.t فى الطبيعة ليس واضـح وقد وضعت العديد من الفرضيات. .B.t قد تكون ممرض حشرى طبيعى ولو أنه مـن النادر أن يحدث له تدوير فى المجاميع الحشرية مما يجعل منه ممرض أنتقالى نسبيا. كذلـك فـأن العديد من عزلات.B.t ليست سامة لأى من المكونات المعروفة فى مجموع

الحشرة من موقع العزل. قد تكون بكتريا تربة طبيعية دون أرتباط مع العينات الأبادية ضد الحشـرات ولـو أن .B.t تـنمو وتتنافس بشكل فقير نسبيا. من أحد النظريات عن الدور الطبيعى لبكتريا .B.t أن هذه البكتريا ذات أرتباط متبادل المنفعة أو تبادلى مع النباتات كى تقدم الحماية ضد آكلات النباتات.

الحـدوث الطبـيعي فـى البيئة: من الناحية التاريخية تم عزل .B.t من البيئات المرتبطة بالمجامـيع الحشرية و/أو المادة النباتية. مثال ذلك أن .B.t أكتشفت فى البداية فى مزارع دودة الحريـر وتم الحصول على عزلات كثيرة من مختلف أماكن تربية الحشرات وبيئات المـواد المخزونة وأماكن تجهيز الحبوب (ohba، ١٩٦٦، Bernhard وآخرون ، ١٩٩٧ ، Kim وآخرون ، ١٩٩٨ –١). حديثا تم أجراء دراسات حصر وأستكشافات عديدة حيث تم عزل .B.t من مدى واسع من أماكن المعيشة فى العديد من الدول المختلفة. لقد وجد أن النسـبة الكبرى ٤٥% من مجموع ٣، ٥٣ عزلة جاءت من المواد المخزونة بينما نشأ ٢٥ % من التربة. المواد التى وجدت غنية فى العزلات النشطة ضد الحشرات كانت من المادة العضـوية مـن عـيش الغراب والمواد المخزونة. الفاعلية ضد حشرات حرشفية ونصفية وغمدية الأجـنحة لاترتبط بالأصل والمصدر مما يوضح التوزيع الكامل النسبى للنشاط الأبادى ضد الحشرات وللبكتريا .B.t بوجه عام. لقد وجد أن نسبة عالية من العزلات غير نشـطة ضد كل الحشرات كما وجد فى دراسات حصر أخرى (مارتن وترافوز، ١٩٨٩). أوضـحت دراسات الحصر الكبيرة أن .B.t لها حدود دنيا من متطلبات النمو لأنها شاملة فـى الـتربة وتعيش فى أماكن أخرى وقد وجدت عندها مقدرة للنمو الخضرى فى التربة المعقمـة في وجود المواد المغذية ولو أن معظم الدراسات لم تشير الى نمو وتضاعف فى التربة غير المعقمة.

الوجـود فـى الـتربة: بالـرغم من أن هذه البكتريا تم الحصول عليها من الحشرات فأن دراسـات الحصـر الحديثة أوضحت أن .B.t تتوزع فى التربة بشكل متفرق ولكن بشكل مـتكرر كما أنها تتوزع بشكل عريض واسع على المستوى المحلى والعائلى. لقد قام كثير مـن العلمـاء بتحليل عينات تربة تم جمعها من كل أنحاء العالم وأتضح أنها توجد فى كل مكـان ويمكـن جمعها من على الشواطئ والصحارى وسهل التندرا فى القطب الشمالى. وجـود .B.t لايرتبط بالحشرات حيث وجد أن بعض البيئات الخالية من الحشرات تحتوى علـى مسـتويات عالية من هذه البكتريا. على نفس المنوال قام ديلوكا وآخرون، (١٩٨١)

بعـــزل .B.t من أراضى عديدة تبعد كثيرا عن تجمعات حشرات حرشفية الأجنحة فى كل مربى أو مناطق تخزين الحبوب فى أمريكا. فى نيوزيلندا وجد شيلكوت وويجلى، (١٩٩٣) أنه بين ٦٠-١٠٠ % من عينات الأراضى المجموعة تحتوى على .B.t بدرجة تعتمد على المصدر.

الوجود فى المجموع الخضرى للنباتات Phylloplane:

لقــد ركـــزت القلـــيل من الدراسات على الحدوث الطبيعى للباسيلليس فى المجموع الخضرى للنباتات. لقد قام Smith and Couche، وآخرون ، (١٩٩١) بحصر المجموع الخضرى لأشجار الصنوبر ومتساقطة الأوراق ووجد أن عزلات .B.t تمثل ٣٠-١٠٠% من مكونات الجراثيم التى توجد على أسطح الأوراق. لقد قام Ohba (١٩٩٦) بعزل .B.t مـــن أوراق شـــجر الـــتوت بينما قام Damgaard وآخرون (١٩٩٧-١) بعزل .B.t من أوراق الكرنب لقد وجد جميع البحاث مدى من العزلات لها نشاط أبادى ضد الحشرات من رتـــب حرشفية ونصفية وغمدية الأجنحة وقد أقترح أن .B.t تمثل جزء من الأحياء الدقيقة لمعظم النباتات. حديثا إتضح أن عزلات .B.t توجد طبيعيا فى المجموع الخضرى لأوراق النجيل فى المراعى.

<u>الوجود الطبيعى لممرضات الحشرات:</u>

لقـــد وجد أن .B.t نادرا ماتسبب إصابات وبائية طبيعية فى مجموع الحشرات. لقد اشـــار Vankova & Purrini (١٩٧٩) الـــى الوبـــاء الطبيعى الذى حدث فى حشرات الحبوب المخزونة إيفستيا بأنواعها فى يوغوسلافيا بسبب .B.t بالرغم من أن هذه البكتريا لـــم تســـتخدم فـــى هذه المناطق على الأطلاق. لقد قام الباحثان بعزل ١٨ سلالة بما فيها B.cercus وســـلالات أخـــرى تنـــتمى إلى الأنواع السيرولوجية كورستاكى وموريسونى وثورنيجيســـيز ولـــم تـــرد بيانات تفيد بوجود حشرات مصابة. فى الهند أشار راجاجوبال (١٩٨٨) أن ٦ر ٥ - ٤ر ٢٦% مـــن يرقات أبرو أريماموديكالا التابعة لحرشفية الأجنحة الـــتى تقـــوم بنجر وعمل أنفاق فى أوراق الفول السودانى مصابة بال .B.t الوبائية. كانت الأصـــابة تنتشـــر بشـــكل أكبر فى المزارع المزدحمة للحشرات كما هو الحال مع ديدان الحرير. لقد وجد برجز وهارست (١٩٧٧) أن ثلثى مجموع حشرات حرشفية الأجنحة فى

المنــتجات المخــزونة تصاب بال B.t. عند مستوى منخفض. فى ٣٨/٢٠ عينات اليرقات الــتى جمعــت ووضــعت تحت نظام حجر دقيق فى المعمل لم تصبح العدوى بالــ B.t. ظاهــرة حتى نمو الجيل الثانى أو الثالث تحت ظروف زحام شديد فى المزرعة المعملية. علــى غــير المألوف فأن اليرقات التى ماتت خلال الوباء وجدت محتلة تماما بمستعمرات B.t. بعــد المــوت وكانت تحتوى على جراثيم وبللورات. هذه اليرقات كانت تحتوى على عديــد مــن الجراثيم ١٠ لكل جثة Cadaver. لقد إتضح أن هذه الجثث كانت بيئة ممتازة للبكتريا B.t..

بالرغم من أن الوباء الذى يحدث بواسطة B.t. نادر الحدوث إلا أنه يوجد العديد من الــتقارير التى تشير الى العزل من الحشرات فى بعض الحالات تم عزل B.t. كواحد من أنــواع عديدة من البكتريا التى وجدت على الجثث مع عدم وجود ما يدل على مأاذا كانت سامة للعائل. مثال ذلك قام بانيزى وبنزوتى (١٩٨٨) بعزل عدد من البكتريا بما فيها B.t. مــن نحــل العسل المصاب بالأكاروس. لقد تم الحصول على عزلات سليمة من الحشرات الميتة بدرجة تفوق البيئات الأخرى.

التدوير فى مجموع العائل Recycling in the host population

معظم الممرضات الحشرية تقتل العائل وتتضاعف فى الجثث ثم تنتقل لعوائل أخرى لــتكرار الدورة. هذا بالرغم من أن B.t. فقير فى أحداث العدوى ومن النادر أن يحدث له تدويــر. بيــنما الخلايا الخضرية والجراثيم تنتج فى الجثث فأن من النادر الأشارة الى أن B.t. تســبب وباء طبيعى. كيفية أحداث الفعل التى تعتمد كثيرا على التوكسين السام وليس العــدوى قــد ترجع الى نقص التدوير. جراثيم B.t. يمكن أن تبقى حية لسنوات طويلة فى الــتربة وفى الغالب يمكن أن تعزل من جثث الحشرات الميتة. لذلك فأن إعادة العدوى فى الحقل بعد التطبيق غير متوقعة ومن ثم يجب الرش السنوى بسبب نقص ثبات التوكسين.

دور بكتريا الباسيلليس فى البيئة:

يوجــد العديد من النظريات عن الملائمة الأيكولوجية بواسطة البكتريا. على عكس معظــم المــيكروبات الممرضــة للحشــرات فأن B.t. عادة يحدث لها تدوير فقير ونادرا ماتسبب وبائيات طبيعية فى الحشرات مما يؤدى الى الأستنتاج بأن B.t. بالضرورة كائن دقيق مولده الأرض يملك نشاط أبادى على الحشرات (مارتن وترافرز، ١٩٨٩). حقيقة أن

B.t. يشـيع وجودهـا فـي البيـئة مسـتقلة عن الحشرات تعضد هذه الرؤية. لقد أقترح Meadows (١٩٩٣) أربعة تفسيرات ممكنة لوجود B.t. فى التربة:

١- B.t. نـادرا ماتـنمو فـي الـتربة ولكنها تجد طريقها اليها وتستقر فيها بواسطة الحشرات.

٢- B.t. قـد تكـون غير فعالة على الحشرات المدفونة فى التربة (هذا غير واضح حتى الآن)

٣- B.t. قد تنمو فى التربة عندما تكون المواد المغذية متوفرة

٤- الـتوافق مـع B. cereus. فـي المقابل أقترح سميث وكوخ (١٩٩١) أن B.t. عبارة عن مكون طبيعى لأحياء المجموع الخضرى حيث يعيش فى صورة تكافل أو تبادل مع النباتات بما يقدم الحماية ضد آكلات العشب. لقد تأكد هذا الحدس من أنـتقال B.t. فى الغلاف الجوى كما ثبت من وجودها فى العينات التى أخذت من العمق فى أوانى ثلجية قبل أجراء عمليات مكافحة الآفات.

الإنتاج وتجهيز المستحضرات Production and formulation

منـتجات B.t. عـادة تحـتوى علـى مخلوط من الجراثيم وبلورات الأندوتوكسين والخلايـا الخضـرية وكناسة الخلايا وبعض المواد المتخلفة من التخمر بالإضافة لعدد من مكونـات المستحضـر الـتى تضاف بغرض زيادة كفاءة المستحضر على الأنتشار على الأوراق والثـبات وطول فترة الثبات فى التخزين أو سهولة التطبيق. لقد ظهر مايزيد عن ١٠٠ سم فى المراجع منذ ظهور المستحضر التجارى الأول عام ١٩٣٨. غالبية المنتجات كانـت مبنـية علـى الأصـناف السـيرولوجية لبكتريا B.t. كورستاكى ، ثورينجينسيز وأسرائيلينيسـيز وايـزاواى. مكونات أى منتج B.t. يحتاج لتقييم منفرد للحكم على الأمان البيـئى لأن هذه المكونات من الخصائص المميزة للمستحضرات ذات الحساسية. من غير المسـتحب أن مكونات المستحضر تختلف عما هو منشور فى التجارب وقد نشرت القليل مـن المشـاكل عـن هذه المكونات. وكالة حماية البيئة الأمريكية USEPA وغيرها من الهيئات التشريعية المماثلة فى الدول الأخرى أعلنت عن عدد من مستحضرات B.t. حالة بحالة ولو أن مانشر عن الأمان قليل.

الإنتاج Production : المادة الفعالة لكل منتج B.t. بوجه عام يصنع بأستخدام عملية تخمر قياسية كما وصف بواسطة بيرجي وجون، (١٩٩٨). خلال التخمر وفى البداية تتضاعف B.t. فى المرحلة الخضرية. عندما يصبح المادة الغذائية حرجة أى تقل بشكل حرج تبدأ B.t. فى التجرثم وبعد ذلك تتحلل الخلايا لتحرير الجراثيم والبروتينات البللورية التى تنتج خلال مرحلة التجرثم. بعد ذلك يتم تركيز المادة حتى الجفاف أو تخلط مع المواد الخاملة فى صورة سائلة ثم تعبأ. لقد أثارت وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA وغيرها من الوكالات حول العالم القلق والمخاوف والأهتمام حول أحتمالية أنتاج توكسينات خارجية للباسيلليس غير مرغوبة لأن تخليقها يبدو أنه يعتمد على نواحى لايمكن التنبؤ بها فى عملية التخمر سواء بالنسبة لتركيب وسط التخمر أو ظروف النمو المستخدمة فى الأنتاج. لقد أوضح Mohd salleh وآخرون (١٩٨٠) أن أنشطة التوكسينات الخارجية من ثلاثة أصناف B.t. تنمو فى ستة أوساط تخمر مختلفة تختلف من وسط لوسط كما أنه توجد نباتات فيما بينها حتى لو نمت على نفس البيئة.

التوكسينات قد تكون توكسينات مخفزة inducible مع تخليق يعتمد على وجود بعض الكيميائيات . كما أنها قد تكون نواتج تمثيل سامة أو تتطلب وجود بعض الكيميائيات كى تتم عملية التخليق أو أن تخليقها معتمد على معايير النمو الطبيعية مثل درجة الحرارة لذلك فإن إختبار قطفة من الإنتاج وكل إنتاج يتطلب الإجراء بدقة وحرص للكشف عن هذه التوكسينات ومدى تلوثها بالبكتريا المرضية للثدييات أذا أخذ فى الأعتبار الأمان البيئى لمكونات المستحضرات والنواتج النهائية فأن الرجوع الى النظم وأحكام EPA فى أمريكا يكون مفيدا للغاية جزئيا بسبب أن العديد من التقييمات متاحة للعامة كما أن العديد من الدول مزجت نظم التقويم الخاصة بها فى ظل الأسترشاد بدلائل EPA و/ أو تمرير البيانات المقبولة بواسطة EPA. مثال ذلك أن EPA يعتقد أنها تعمل على تقليل الخطر الذى قد ينجم من وجود التوكسينات الخارجية فى المنتج النهائى خلال الأنتاج عن طريق وضع طلبات جديدة فى نظام التسجيل (March، EPA، ١٩٩٨). الشركات التى ترغب فى تسجيل منتجاتها يجب أن تتوخى وتتبع العمليات القياسية فى التصنيع بما يكفى لمنع أنتاج الكميات الكبيرة من التوكسينات الخارجية. أمان المنتجات يجب أن يتأكد من خلال أجراء إختبارات على قطفات الأنتاج بأستخدام الطرق الموضوعة مثل الحقن تحت الجلدى لواحد مليون جرثومة على الأقل فى كل فأر من خمسة وأختبار السمية على يرقات الذباب أو الكشف عن البيتا – أكسوتوكسين بجهاز HPLC (EPA، ١٩٩٨، ص ٣٨– ٣٩).

هـــناك مقـــدرة للسلالات .B.t لأنتاج البيتا – أكسوتوكسين خلال النمو المتتابع فى المستحضـــرات النهائـــية بالرغم من عدم الكشف عنها فى قطفات الأنتاج. ليكن معلوما أن الســـلالة ذات المقدرة على أنتاج البيتا – أكسوتوكسين يجب أن تكون محتوية على الجينات الـــتى تشـــفر الأكسوتوكســـين. اذا كانـــت الســـلالة المســـتخدمة قادرة على أنتاج البيتا– أكسوتوكســـين فأن الوكالة EPA تطلب من المنتج التأكد من عدم وجود توكسين فى المادة الفعالـــة. بالأضـــافة الـــى ذلـــك فأن المنتج يجب الا يوضع فى وسط يشمل نواتج نهائية كمستحضـــرات تسمح بالإنبات و/أو النمو فى أى وقت قبل التطبيق. المنتج النهائى يجرى علـــيه أختـــبارات للكشـــف عن الأكسوتوكسينات من خلال التقييم الحيوى ضد الدافنيا مع أستخدام أقصى جرعة ضارة ولو أن طرق أخرى تم تطويرها.

الأمان البيئى لمكونات مستحضرات .B.t:

مكونات المستحضرات :

منـــتجات .B.t تحـــتوى على نسبة مئوية كبيرة من البكتريا ووسط التخمر كما أن المـــواد الأضـــافية تستخدم فى الغالب لتحسين ثبات المستحضر وتحقيق الصفات المطلوبة مـــثل الأنسيابية فى الماء Flowability. مستحضرات المبيدات تحتوى على أسرار ولكن للحصـــول علـــى الموافقة بالتسجيل يجب أن تقدم هذه الأسرار للسلطات المعنية بالتشريع. حيـــث أنـــه توجـــد أختلافات بين مستحضرات .B.t فأن أمان مركب أو مستحضر ما لا تنعكس على أمان الأخرين. العديد من الشركات تستخدم المواد الفعالة التى تظهر فى قائمة معروفة فى أمريكا والتى عرفت بأنها آمنة بوجه عام generally recognizel as safel (GRAS). لقـــد تم توصيف الأمان لهذه المواد الفعالة بواسطة هيئة الغذاء والدواء FDA وعرفـــت بأنهـــا آمـــنة عندما تستخدم كمواد أضافية مباشرة للغذاء والتى تسمح للشركات بتجنـــب السمية الزائدة وأجراء الأختبارات الخاصة على المستحضرات النهائية. إختبارات السمية على المادة الفعالة التى لم تجهز مستحضراتها مازالت مطلوبة.

مكونـــات المواد الأضافية والمستحضرات النهائية يمكن أن تؤخذ فى الأعتبار عند مـــراحل متعددة خلال العملية ولأسباب متعددة. لقد عدد بيرجيز رجونز (١٩٩٨) عدد من المـــواد الأضافية التى تستخدم من .B.t بما فيها المواد الناثرة والحاميات من الجفاف مثل الصـــمغ العـــربى واللاكـــتوز. إضافة أيونات الكالسيوم Ca^{+2} أستخدمت لترسيب البيتا –

أكسوتوكسينات. بعد التخمر يمكن أستخدام المواد الأضافية فى المنتجات لتحسين التخزين والثبات وكفاءة الأنتشار والتطبيق. لقد أستخدمت مستحضرات مختلفة من B.t. على الحشرات المستهدفة فى أماكن المعيشة المختلفة أو حيث يكون للأنواع المستهدفة عادات تغذية مختلفة. مثال ذلك المحببات والكبسولات والمستحضرات السائلة التى تعتمد على تحت الأنواع مثل B.t. كورستاكى واسرئيلينيسيز. لقد تم تطوير مستحضرات خاصة للتطبيق فى الماء. مثال ذلك عندما تكون يرقات البعوض المستهدفة تتغذى فى الأعماق وكذلك على أسطح الماء أو تتغذى على طول عمود الماء.

لقد تم تجهيز مستحضر B.t. كمساحيق جافة مع بودرة التلك (مادة حاملة) ومسحوق السليكا (مادة إنسابية) ومحببات الصلصال مع مواد لاصقة ومحببات قابلة للأنتشار فى الماء (نشا الذرة أو الجينينية أو سوائل فى أساس الجيل). بالنسبة للرش تضاف الزيوت والمواد التى تضيف سمك. حوالى نصف منتجات B.t. الموجودة حاليا عبارة عن مستحلبات زيت فى الماء (بيرجز وجونز ، ١٩٩٨). من الناحية التقليدية تشمل مركزات B.t. القابلة للأنسياب فى الماء مواد التخمر الصلبة (مع جراثيم وبللورات B.t.) والمواد الناشرة ومواد التعلق (مثل الصمغ) والمواد التى توقف النمو الخضرى للفطريات بشكل مؤقت Fungistatic والمواد التى توقف نمو البكتريا bacteriostati والماء بينما المركزات القابلة للأنسياب ذات الأساس الزيتى تحتوى على المسحوق النقى والمادة الحاملة (زيت) ومادة التعلق (نيتونيت) ومادة منشطة (كربونات البروبيلين).

لقد أستخدمت المواد الأضافية للمستحضرات لتحسين كفاءة منتجات B.t. بالنظر الى تغطية المادة المرشوشة لسطوح الأوراق النباتية ومقاومة المطر المنهمر. المواد ذات الجذب السطحى surfactants تحسن من التغطية على الأوراق الكارهة للماء وتسهيل خلط الجراثيم المقاومة أو الكارهة للماء وبللورات التوكسين فى الماء وتكوين مستحلب بين الزيت والماء عن طريق تقليل الجذب بين السطحى. لقد وجد ستفين وآخرون، (١٩٩٤) أن سيلويت – أل – ٧٧، المادة الجاذبة سطحيا السليكون العضوى تزيد من كفاءة B.t. فى حماية الحاصلات البستانية. المواد اللاصقة تحسن من الثبات ضد المطر حيث أن التوكسينات والجراثيم تغسل من على الأوراق مما يقلل من نقص الثبات. كذلك تضاف المواد التى تحجب أشعة الشمس sunscreens الى مستحضرات B.t. لأن التعرض للأشعة فوق البنفسجية ULV يقلل من الثبات. التأثيرات الضارة لبعض مضافات المستحضرات ذات أهتمام كبير. مثال ذلك أن المواد السطحية غير الأيونية المسماة

أجـــزال، كليتويت، DX، تاب في المحلول المائي عند مستوى ١٠ جزء في المليون تؤثر علـــى أنـــبات بذور ونمو السورجم (Horowitz، ١٩٧٧). يفضل أستخدام زيوت الخضر بدلا من الزيوت المعدنية لأنها أقل أحداثا للضرر على النباتات (بيرجز وجونز ، ١٩٩٨).

لقـــد أختبرت كفاءة منشطات التغذية خلطا في التنك مع منتجات .B.t لزيارة تناول التوكســينات والجراثـــيم. لقـــد أستخدم المولاس والسكريات والذرة ونخالة القمح وبعض منشـــطات التغذية المتاحة (كواكس، فيسيت، جاستو، أنتيك) فارار وريدجواى – ١٩٥٥ – أ). لقد وجد باتى وكارنر ، (١٩٧٤) أن الديبيل كان أكثر فعالية ضد ديدان اللوز الأمريكية عـــند أضـــافته لطعـــوم منشـــطة التغذية. لقد قام سلامة وآخرون، (١٩٨٥) بفحص كفاءة منشـــطات الـــتغذية مع B.t. entomocidus ضد دودة ورق القطن بأستخدام مستخلصات مـــن بعض النباتات (مولاس – دقيق فول صويا – دقيق بذرة القطن – سكروز). لقد وجد أن العديـــد من المركبات مثل المولاس والسكروز زادت من فاعلية .B.t من جراء زيادة تـــناول التوكســـينات. لقـــد وجد أن كثير من المواد تنشط .B.t. لقد سجل بيرجز وجونز ١٩٩٨ الأحمـــاض الأمينـــية والمواد الجاذبة السطحية والأملاح غير العضوية والأحماض العضـــوية وأملاحهـــا والمركبات الفينولية ومثبطات البروتييز والمواد المذيبة للبروتينات وحـــامض الأســـكوربيك والكافين وديمثيل سلفوكسيد وداى سيكلاميد وحامض ديبيكولينيك وبروتيـــن إنهانســـين مـــن فيروس جرانيولوزيس والنيمازال- تى، حامض الساليسيلليك، حـــامض أمينوساليسيلليك، وحامض سوربيك. درجة التأثير التنشيطى وصلت ١×٥ مرات زيـــادة في الفاعلية ولكنها وصلت ٤٠ مرة في بعض الحالات. لقد ظهر كذلك أن المبيدات الكيميائية تزيد من فاعلية .B.t.

الأمان البيئى:

التأثـــير البيـــئى لمكونات مستحضرات .B.t يصعب تقييمه لحد كبير بسبب طبيعة المكونـــات ونقـــص المنشور عن الفعل المستقل لكل من هذه المكونات كما ذكر قبلا. لقد فصـــلت العديـــد مـــن الدراسات بين سمية مكونات المستحضر عن سمية توكسينات .B.t والجراثـــيم. فـــى نيوزيلـــندا أصـــبح هذا الوضع محل تناول عندما أقترح إستخدام .B.t كورســـتاكى (ريبـــيل) في حملة أستئصال الوباء الناجم عن أورجيا تيللينا في أماكن سكنى الحضـــر. لقـــد شـــملت الحملة الرش المكثف فوق مدن نيوزيلندا بالطائرات حيث أخذ في الأعتبار مكونات المستحضرات بشكل ضرورى. لقد كان المنتج رافضا لأستخدام مكونات

مستحضـــرات حساسة بشكل تجارى. لقد خلص الجميع الى أنه كلما أقتربت المستحضرات مـــن عامـــة الناس كلما زادت الحاجة لتحقيق وضمان الأمان. لغرض التسجيل كانت تعلن مكونـــات المستحضر بشكل سرى للغاية فى ظل إتفاقية مكتوبة كما يجب تقديم كل البيانات الخاصة بالأمان.

لقـــد أشـــارت بعض التقارير أن السمية على النحل والفئران كانت ترجع جزئيا الى المـــواد الحاملـــة فـــى المستحضـــرات الأولية (Forsberg وآخرون ، ١٩٧٦). ولو أن الـــتقارير أشـــارت الى أن البيتا – توكسينات توجد فى المستحضرات ولم يكن من الممكن فصـــل تأثيراتها. لقد أشارت العديد من الدراسات الى أمان مكونات المستحضرات لمركب الدايبـــيل. لقـــد قـــام Haverty ، (١٩٨٢) بدراسة سمية المادة الحاملة للدايبيل 4L ضد المفترســـات والطفيلـــيات. دايبـــيل ٤- ال معلـــق قابل للأستحلاب غير مائى للباسيلليس كورســـتاكى وكـــان هناك أهتمام حول سمية الزيت بعد التغيير من أستخدام المستحضرات المائية الى تلك التى تبنى على الزيت. الموت الذى يتسبب من الحامل لايزيد عن ١، ٢% على أى من الأنواع غير المستهدفة عند معدل ٤، ٩ لتر/هكتار. عندما أستخدم بمعدل ٧ر ١٨ لتر/هكتار كانت نسبة موت المفترسات الكاملة كريزوباكارينا ، هيبوديميا كونفرجينيز أعلى من المقارنة ولكن ذلك لم يحدث مع الطفيل أفيتيس ميلينس. لم يزداد الموت عن ٤ر ١٣% لأى نوع. فى دراسة أخرى وجد هولمز (١٩٩٥) أنه عندما كانت .B.t كورستاكى غـــير المجهـــزة والديبـــيل المائى بدون تأثير على الكولومبولا والفولسوميا كانديدا كانت مستحضـــرات الدايبـــيل الزيتـــية ذات تأثيرات سالبة. لقد أدى ذلك الى الأقتراح بأنه توجد ســـمية مباشـــرة أو غـــير مباشـــرة لمكونات المستحضر. على نفس المنوال وجد أديسون وهولمـــز، (١٩٩٦) أن ١٠٠ ضعف فى التركيز البيئى للدايبيل ٨ إلى قليل من بقاء ونمو وأنتاج شرانق دودة الأرض فى الغابات ولم يحدث هذا التأثير من الباسيلليس كورستاكى أو الديبيل المائى 8 AF .

المنتجات Products:

منـــتجات .B.t تمـــثل ٩٠% أو مايزيد من المبيدات الحيوية التى تباع على مستوى العـــالم فـــى الوقت الراهن (سواندر، ١٩٩٤). العديد من المنتجات (مثل ديبيل وثوريسيد وبيوبيـــت) تبـــنى على .B.t كورستاكى HD-1 وهى السلالة القياسية بسبب النشاط ضد مايـــزيد عـــن ١٠٠ نـــوع من الحشرات حرشفية الأجنحة (نافون ، ١٩٩٣). لقد تم وضع قوائم تحتوى على ١٦٧ نوع من حرشفيات الأجنحة حساسة للديبيل. هناك منتجات أخرى

مبنـــية علـــى سلالات .B.t مع مدى واسع من العوائل الأكثر تخصصا وهى ذات أسواق محـــدودة. بســـبب الأهـــتمام عن السمية على الثدييات فأن العديد من المنتجات من الأتحاد الســـوفيتى ســـابقا ودول الكـــتلة الشرقية التى تبنى على الطرز السيرولوجى تحتوى على الغالب على مايزيد عن ٢٠% أكسوتوكسين (نافون، ١٩٩٣).

لكـــى نفهـــم مـــاهو منشور فى الدراسات المرجعية يفضل الربط مابين أسم المنتج وتحـــت الـــنوع أو الصـــنف. الجدول (١-٣) يوضح الأسماء التجارية والآفات المستهدفة والشركة المنتجة وبلد المنشأ:

جـــدول (١-٣): الأســـماء الـــتجارية وتحت الأنواع فى بكتريا B.t. والآفات المستهدفة والأصل.

Subspecies/product	Taget pest	Company country of origin
Kurstaki		
Astur (asporogenic)	Lepodoptera	Bushkovskaya et al 1994
Bacilan	Lepodoptera	Lonc et al 1986
Bactec bertan B.t.	Lepodoptera	Bactec corporation
Bactospeine1	Lepodoptera	Abbott: Starnes et al 1993
Bactucide	Lepodoptera	Switzerland: Triggiani&
Baktur	Lepodoptera	sidor 1982
Bathurim	Lepodoptera	Scalco et al 1997
Bioasp(asporogenic)	Lepodoptera	Slovakia: Novotny& Svestka 1986
Biobit	Lepodoptera	India:Satapathy&panada 1997
Biodart	Lepodoptera	Abbott: starnes et al 1993
Biolep(sporogenous)	Various	ICI Canada: Bemier et al 1990
Biotrol2	Lepodoptera	India: Satapathy & Panada 1997
B.t. Turex	Lepodoptera	Bishop et al 1973
Condor	Lepodoptera	Spain: Cortes& Borrero 1998
CoStar	Lepodoptera	Ecogen: Starnes et al 1993
Crymax	Lepodoptera	Thermo trilogy: Shah&Goettel 1999
Cutlass	Lepodoptera	Ecogen:Shah& goettel 1999
Delfin	Lepodoptera	Ecogen: Starnes et al 1993
Dipel3	Lepodoptera	Thermo: Trilogy
Foray	Lepodoptera	Abbott: Shah &Goettel1999
Futura	Lepodoptera	Abbott: Shah &Goettel1999
Javelin	Lepodoptera	Abbott: Starnes et al 1993
Lepidocide	Lepodoptera	Thermo trilogy: Shah&Goettel 1999
Lepinox	Lepodoptera	Goral et al 1984
Manapel	Lepodoptera	Ecogen: Shah & Goettel 1999
Mattch	Lepodoptera	Brazil. Cnv 1977
MVP4(Cry 1 Ac)	Lepodoptera	Myeogen
MYX4(Cry 1 Ab)	Lepodoptera	Myeogen Nyouki et al 1996
Novabac	Lepodoptera	Myeogen Nyouki et al 1996
Novosol	Lepodoptera	Randall et al 1979 Abbott

تابع جدول (١-٣): الأسماء التجارية وتحت الأنواع فى بكتريا B.t. والآفات المستهدفة والأصل.

Subspecies/ Product	Target pest	Company, country of origin or reference
Rapax	Lepidoptera	D'-Offria *et al.* 1996
Raven[5]	Coleoptera	Ecogen; Shah & Goettel 1999
Safer	Lepidoptera	Home Harvest, http://homeharvest.com/bt.htm
SAN415	Lepidoptera	Hegazy & Antounious 1987
Sok-Bt	Lepidoptera	Reigart & Roberts 1999
Toarow[6]	Lepidoptera	Japan; Wysoki *et al.* 1986; Navon 1993
Thuricide[5, 7]	Lepidoptera	Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999
Tribactur	Lepidoptera	Netherlands; Nef 1972; Reigart & Roberts 1999
Wormbuster	Lepidoptera	Bactec; Starnes *et al.* 1993
Zoocamp	Lepidoptera	Brazil; Habib 1986
Fluidosoufre BTR (- sulfur)	Lepidoptera & mildew	France; Goebel *et al.* 1997
Bacilex (+ *aizawai*)	diamondback moth	Kimura 1991; Asano & Seki 1994
Agree (+ *aizawai*)	diamondback moth	CIBA-GEIGY; Ivey & Johnson 1997, 1998
Biocilis (+ *aizawai*)	tortricids	France; Fougeroux & Lacroze 1996
aizawai		
Xentari/Zentari/Centari	Lepidoptera	Abbott; Shah & Goettel 1999; most of the world/Japan/Thailand
Certan	wax moth/Lepidoptera	Sandoz; Starnes *et al.* 1993
Clorbac	Lepidoptera	Federici 1999
Design WSP	Lepidoptera	Mascarenhas *et al.* 1998
Florbac	diamondback moth	Abbott; Starnes *et al.* 1993
Quark		Abbott
Selectzin	Lepidoptera	Poland; Lipa *et al.* 1977; Takaki 1975
Turex	Lepidoptera	Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999
israelensis		
Acrobe	Mosquitoes/ Blackflies	American Cyanamid; Starnes *et al.* 1993
Aquabac	Mosquitoes/ Blackflies	Reigart & Roberts 1999
Bactimos	Mosquitoes/ Blackflies	Abbott; Shah & Goettel 1999
Bactoculicide	Mosquitoes/ Blackflies	USSR; Kanybin 1991
BMC WP	Mosquitoes/ Blackflies	Reuter
Bulmoscide		Halkova *et al.* 1993
Cybate (Aust. label)	Mosquitoes/ Blackflies	Cyanamid
Duplex (+methoprene)	Mosquitoes/ Blackflies	Zoecon - PPM
Gnatrol	Fungus gnats	Abbott; Starnes *et al.* 1993
JieJueLing preparation	Mosquitoes/ Blackflies	China; Shah & Goettel 1999
MieJueLing preparation (+ strain CS8)	Mosquitoes/ Blackflies	China; Shah & Goettel 1999
Skeetal	Mosquitoes/ Blackflies	Abbott; Chang *et al.* 1990
Teknar	Mosquitoes/ Blackflies	Thermo Trilogy; Shah & Goettel 1999
Vectobac	Mosquitoes/ Blackflies	Abbott; Shah & Goettel 1999
tenebrionis		
Foil	Coleoptera	Ecogen; Starnes *et al.* 1993
M-Trak[5]	Coleoptera	Mycogen, Starnes *et al.* 1993
M-One	Coleoptera	Mycogen; Starnes *et al.* 1993
Novodor	Coleoptera	Abbott; Shah & Goettel 1999
NovoBtt	Coleoptera	Abbott; Panetta 1989
Trident	Coleoptera	Sandoz; Starnes *et al.* 1993

تابع جدول (١-٣): الأسماء التجارية وتحت الأنواع فى بكتريا .B.t والآفات المستهدفة والأصل.

Subspecies/ Product	Target pest	Company, country of origin or reference
Muscabac (+exo)	Diptera	Finland, USSR; Powell *et al.* 1990; Pinnock & Milner 1994
Porasporin	Lepidoptera	Grain Processing Corp., USA; Forsberg *et al.* 1976
Tarmik	Lepidoptera	Turkey; Tutkun *et al.* 1987
Thiodane	Diptera	Farghal *et al.* 1987
Thuridan	Lepidoptera	Poland, Glowacka-Pilot 1984
Thuringin (+ exo)	Various	Tonkonozhenko 1981
Toxobacterin ("Insectin enriched with Enzotoxin [sic]")	Lepidoptera	USSR; Spektor & Vykhovets 1975; Malokvasova 1979
alesti		
BIP[9]	Lepidoptera	Daricheva *et al.* 1983; Goral *et al.* 1984
Alestin	Lepidoptera	USSR; Mitrofanov & Novozhilov 1982
Anidal	Lepidoptera	Creighton *et al.* 1972
galleriae		
Entobakterin	Lepidoptera	USSR; Rimmington 1989
Qing-Chong-Jun No. 6 (+cypermethrin)	mites	China, Dong & Niu 1991
Spicturin	*Plutella* spp.	India; Shah & Goettel 1999
caucasicus [10]		
BIP[9]	Fleas, Lepidoptera	USSR; Afrikyan & Chil Akopyan 1980
chinensis		
Shuangdu preparation	Lepidoptera, Coleoptera & Diptera	China; Shah & Goettel 1999
darmstadiensis		
Bacicol	Coleoptera	USSR; Kandybin & Smirnov 1996
dendrolimus		
Dendrobacillin	Various	USSR; Rimmington 1989
sotto		
Cellstart	Lepidoptera?	Japan; Takaki 1975
Subspecies not stated		
Bitayon	Lepidoptera	Israel; Shah & Goettel 1998
Bt8010, Rijin	Lepidoptera	China & Malaysia; Shah & Goettel 1999
Cajrab	Lepidoptera	India; Srivastava & Nayak 1978
Dibeta/SAN (+exo)	Acari & Hemiptera	Grau 1987; Williams *et al.* 1987
Disparin	Lepidoptera	Bulgaria; G'oncv 1977
Halt	Lepidoptera	Wockhardt, India, Lal & Lal 1996
Junduwei (+HaNPV)	*Helicoverpa armigera*	China; Zhang *et al.* 1996
Miazol (+exo)	Myiasis in animals	Tonkonozhenko *et al.* 1977
Plantibac	Lepidoptera	Minco 1970
Shachongjin	Coleoptera, Lepidoptera & Diptera	China; Lin *et al.* 1990a,b
Sporeine	Lepidoptera	France 1938 (first *Bt* product) Lambert & Peferoen 1992
Subdu (+ *B. subtilis*)	Diptera	Campbell & Wright 1976
Tarsol	Lepidoptera	Krieg 1978
Thuringitox	Mites & Lepidoptera	Ilascu 1980
Turingin	Diptera	Yarnykh & Tonkonojenko 1975
Ybt-1520	Lepidoptera	China, Shah & Goettel 1999

الباب الثاني

تأثيرات بكتريا الباسيلليس على الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة في البيئة

تأثيرات بكتريا الباسيلليس على الحشرات والميكروبات واللافقاريات والفقاريات غير المستهدفة فى البيئة

مقدمة وتقويم للفصول الثلاثة:

لقد مر الباب الاول بسهولة ويسر وفى وقت قصير بسبب تلهفى لمعرفة المزيد عن هـذا النـبع والمصـدر الدائم والكريم والمستمر الطبيعى للحصول على مستحضرات من الطبـيعة خاصـة مـن الارض تحـتوى على مواد فعالة تبيد الحشرات مع اعتقاد العامة والخاصـة بالامان المطلق لهذة البكتريا على الانسان والبيئة والكائنات غير المستهدفة. لقد خرجت من استعراض الباب بامكانية وعدم صعوبة الحصول على هذة الوسيلة الفعالة التى يمكـن ادخالهـا بشكل مدروس وعقلانى فى برامج الادارة المتكاملة للافات الحشرية. لقد تاكدت فى وجود الاف من السلالات فى بنوك خاصة على مستوى العالم كما هو الحال مع بـنوك الاصـول الوراثـية. اسـتتبع ذلـك سعادتى بالنجاح فى الحصول على العديد من السـلالات المصـرية الاصـل والتى امكن عزلها من البيئة المصرية الغنية ليس بالعدس والفـول والغـذاء بـل والكائنات الدقيقة النافعة بواسطة الزملاء الخبراء فى معهد بحوث الهندسـة الوراثـية بوزارة الزراعة. لقد اصبحت على دراية بسبل الحصول على سلالات بكـتريا الباسـيلليس من البداية وحتى الان فى الدول المختلفة واسس التعريف والتوصيف وتحديـد الخصائص والمواصفات لكل سلالة ناهيك عن طرق العزل والتصنيف والتنمية. اذا كانت الباسيلليس تمثل ما يزيد عن ٩٠% من المبيدات الحيوية فانها تستحق معرفة كل مـا يحـيط بهـذة الوسـيلة فـى مكافحة الافات وطرق التطبيق. لقد اثر فى جدا امكانية اسـتخدامها بالطائـرات بالـرش الجوى فوق المدن المأهولة بالسكان دون خوف من اية اضـرار على الانسان والبيئة. لقد كان ما تم جمعة من دراسات مرجعية عن المواد السامة او التكسينات الداخلية وهى الفعالة ضد الحشرات ذات الامان النسبى العالى وما يقابلها من التوكسـينات الخارجية بيتا عديمة التاثير على الحشرات والتى لها اضرار لا يمكن انكارها علـى الانسـان ومن ثم تكون هناك ضرورة ملحة لتنقية المستحضرات بحيث تكون خالية مـن التوكسـينات الخارجـية وهذا ليس بالامر السهل او الهين. كذلك تناولت الدراسات المرجعـية دور الجراثيم والبللورات التوكسينية فى احداث الفعل والتاثيرات على الحشرات المسـتهدفة والكائـنات الاخـرى غير المستهدفة. اشارات الدراسات المرجعية الى اهمية الوسـائل الفينولوجية والسيرولوجية وتلك التى تعتمد على الجامض النووى "الدنا" وتفاعل

سلسلة البوليميريز PCR وجامض الدنا الريبوسومى ومقارنة الكروموسومات فى التعرف على الباسيلليس وتوصيفها ثم جاء الدور على تناول التوكسينات الخارجية والداخلية وكيفية احداث الفعل لكل منها .... الخ.

الفصل الاول

السمية على الحشرات Toxicity to insects

الاخـــتلافات بيـــن السلالات وما بين طرق التقييم الحيوى وصعوبة تقدير المكونات الفعالـــة لبكتريا Bt ومستحضراتها بالاضافة الى التاثيرات البيئية والعوائلية على السمية .. كـــل ذلـــك اشـــترك فـــى تعقيدات تقويم سمية الباسيلليس على الحشرات وتحديد التاثيرات الممكنة على الاحياء والكائنات غير المستهدفة. لا يوجد طرز سيرولوجى فعال ضد واحدة فقط من رتب الحشرات. لقد اشارت التقارير الاولى عن Bt انها متخصصة على حشرات حرشفية الاجنحة ، ولكن مع توالى الاستكشافات عن سلالات جديدة تاكد ان Bt ذات مدى واسع من النشاط حيث اظهرت السلالات سمية على ما يزيد عن ٣٠٠٠ نوع تتبع ما يزيد عن ١٦ رتبة من الحشرات. لقد امكن وضع بعض التعميمات فيما يتعلق بالمدى العوائلى: الباسيلليس كورستاكي ، ايزاوايا ، ثورينجينسيز ، اليستى ، دندروليمس / سوتو (سامة ضد حرشـــفية الاجـــنحة) ، باسيلليس Bt اسرائيلينسيز ، دارمستارينسيز (ثنائية الاجنحة) ، Bt تينيبريونـــيز وجابونســـيز (غمدية الاجنحة). حيث ان تعريف تحت انواع Bt مثل الصنف الســـيرولوجى تســـتخدم للتنـــبؤ بنظام التوكسين فى السلالات فان حساسية العائل لا يمكن استخدامها او تقريب معرفتها باستخدام الصنف السيرولوجى والتقسيم كمجاميع.

تتحقق التخصصية بواسطة الدلتا – اندوتوكسين لوحدها ومخلوط الاندروتوكسين فى العـــزلة الفردية وهذة قد تتداخل لزيادة (تنشيط) واحيانا انقاص السمية على حشرة معينة. فى بعض الحالات فان الجراثيم تزيد كذلك من كفاءة مستحضرات Bt. نوع المستحضر قد يؤثـــر على مدى وتنوع النشاط فقد وجد ان المستحضرات المختلفة من نفس السلالة تظهر اخـــتلافات تصل لعشرة امثال فى السمية خلال تجارب التقييم الحيوى المقارن. لقد شغلت مقارنـــة ســـمية ســـلالات Bt اهتمام العديد من العلماء لدرجة انة تم وضع مقاييس دولية لمستحضـــرات الباســـيلليس كورســـتاكى واسرائيلينسيز. مازالت هناك صعوبات فى وجة المقارنـــة بين طرق التقييم الحيوى والحشرات المختلفة والعديد من الوحدات التى تستخدم للتعبـــير عـــن المواد الفعالة. كل من سلالات الباسيلليس فعالة ضد عدد محدود من انواع الحشـــرات وفـــى الغالـــب تكـــون فعالة ضد قليل من رتب الحشرات فقط تحت الظروف المخـــتلفة. فـــى المعمل قد تكون بعض الحشرات والكائنات الحية الاخرى حساسة فقط مع الجـــرعات العالـــية جدا. التقارير عن الحساسية لمستحضر الديبيل تفيد فى المقارنة لانها

مبنــية علــى سلالة فردية لسنوات طويلة متعددة حيث اظهرت سمية قليلة فى الحقل على افــراد مــن حشــرات حرشــفية الاجــنحة وكان هناك تحمل نسبى لعدد من المفترسات والطفيليات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة.

لقــد تــم تســجيل حشرات غير حساسة فى ١١ من الرتب التى تحتوى على انواع حشرية حساسة. لقد وجدت اختلافات فى داخل النوع فى اتجاه حساسية الحشرات للبكتريا Bt حــتى مع استخدام مركب واحد. بينما تظهر العديد من الحشرات حساسية فى المعمل فــان نفــس الحشرة قد لن تتاثر تحت ظروف الحقل. الاختلاف بين الحساسية فى المعمل والحقــل قد ترتبط بالجرعة ومستوى التعرض وسلوك التغذية وايكولوجيا الجشرة او خليط مــن كل هذة العوامل. من العوامل الاخرى مثل ثبات Bt قد تقلل من تاثير الباسيلليس فى الحقل.

تقييم السمية على الحشرات Assessing toxicity to insects

فهم سمية Bt:

كما ذكر سابقا فان سمية Bt تعتمد على نوع التوكسينات والجراثيم والتى تعبر عنها فــى كــم العزلات والتى يمكن تجهيزها بواسطة طرق عديدة بما فيها الانتيجيات (اصناف ســيرولوجية). تمييز السمية المتعددة لمختلف تحت الانواع والتوكسينات التى تنتج بواسطة Bt ضرورى لفهم حدود الفصل الابادى ضد الحشرات وتقويم الخطورة على الكائنات غير المســتهدفة. مــن الصعوبات التى تجابة تقييم الامان البيئى او حتى فهم توكسيكولوجيا Bt يتمــثل فــى الاتفــاق على الاصطلاحات المرتبطة بال Bt وهى الاصناف وتحت الانواع والاصــناف السيرولوجية والتوكسينات والمستحضرات النهائية ولو انها جميعا استخدمت دون تقييد فى التعريف لوصف وحدة العنفوانية. فى العديد من الحالات عندما يستخدم منتج خــاص او تحــت نــوع خاص فان التوكسينات الواقعية التى تسبب النشاط ضد الحشرات ليســت مــتماثلة تمامــا ولم تعرف. لذلك فانة من الصعوبة البالغة مقارنة النشاط الخاص للباســيلليس من خلال المراجع. هناك صعوبة اضافية تتمثل فى ان مدى واسع من الطرق قــد اســتخدم لتقيــيم الكفــاءة. دور الجراثيم فى الكفاءة متفاوت حيث ان بعض الدراسات اشــارت الــى الفعــل الابــادى على الحشرات عندما توجد الجراثيم عنه فى حالة وجود المستحضــرات البللورية. فى العديد من الحالات لم تساهم الجراثيم بشكل معنوى فى كفاءة باسيلليس Bt.

استخدام السلالات المرجعية:

صعوبة المقارنة بين العزلات وتوكسينات Bt اصبحت ظاهرة خلال الفترة ١٩٦٠-١٩٧٠. كما اشار Dulmage واخرون (١٩٨١) فانة يستحيل من الناحية العملية ان تتكرر بشكل متطابق ظروف التحليل الحيوى لتقدير التركيزات النصفية القاتلة LC 50. لقد ادى ذلك الى الافتراض بان عدد من السلالات القياسية مختارة للاستخدام فى كل تجارب الفاعلية على Bt. السلالة القياسية الاولى التى تمت الموافقة عليها بين الدول والمؤسسات الصناعية المختلفة والمعامل الحكومية والاكاديمية هى سلالة Bt.thuringiensis (E61) التى جهزت فى فرنسا (المنتجات الصناعية المبكرة كانت تحتوى هذا التحت نوع (الصنف) مع كفاءة مقدرة ١٠٠٠ وحدة دولية سامة (ITU) او وحدات دولية (IU) مللجم (فاجو وبرجز١٩٦٤، برجز ١٩٦٧ – أ ، برجز واخرون ١٩٦٧ ، دلماج واخرون ١٩٨١). لقد اقترح دلماج (١٩٧٥) سلالة قياسية اخرى HD-1-S-1971 مبنية على Bt kurstaki عندما تقوم تحت النوع هذا الاكثر فاعلية محل الباسيلليس ثورينجيسيز فى معظم المنتجات. "1-1D" تشير الى العزلات من وزارة الزراعة الامريكية USDA للباحث Howard Dulmage ومجموعة Bt الخاصة بهما والتى يحتفظ بها فى مجموعة ARS / USDA فى بيوريابولاية النيوى (دلماج واخرون – ١٩٨٨). لقد قدرت كفاءة HD-1-S-1971 بمقدار ١٨٠٠٠ وحدة دولية/ملليجرام على اساس التحليل الحيوى ضد E-61. لقد كانت هذة مقارنة بين تحت نوعين مع مدى عوائلى مختلف وتعطى دليل على الكفاءة النسبية فقط على الحشرة المعنية. لقد اصبح الحصول والتزود بسلالة HD-1-S-1971 متاحا بعد ذلك وبعدها ثم عمل HD-1-S-19 كسلالة قياسية اولية بقوة فاعلية ونشاط ١٦٠٠٠ وحدة دولية/مللجم (Beegle واخرون –١٩٨٦). لقد استخدمت ثلاثة سلالات قياسية من Bt اسرائيلينسيز ، IPS-78 ، HD-968-1983، IPS-82. لقد قدرت كفاءة HD-968-1983 بمقدار ٤٧٤٠ وحدة دولية/مللجم ضد يرقات بعوض ايدس ايجبتى (دلماج واخرون – ١٩٨٥).

قياس الصحية:

لقد تم تحديد الكفاءة باستخدام بيانات العلاقة بين التركيز والموت وتحويلها الى لوغاريتم – الاحتمال ومقارنة التركيز النصفى القاتل LC50 لمادة الاختبار مع المادة القياسية. كما اشير بواسطة Skovmand واخرون (١٩٩٧) ان العقلانية

تعنى امكانية حساب الاختلافات اليومية فى داخل المعمل وفيما بين المعامل بغرض استخدام القيم النسبية بالاضافة الى السلالات القياسية ثم اقتراح بروتوكولات قياسية (Mc-Langhlin واخرون – ١٩٨٤) ولكن الاختلافات مازالت موجودة بين المعامل.

كفاءة المستحضر عادة تحدد بقياس المادة فى مقابل المستحضر القياسى ويعبر عنها فى مسميات ITU/mg. يتم حساب الكفاءة من:

Lc50 للمادة القياسية × كفاءة المادة القياسية = كفاءة العينة IUT / مللجم Lc50 للعينة

لقد برزت صعوبات مقارنة السمية من خلال الدراسة التى اجراها سكوفماند واخرون (١٩٩٧) الذى قام بمقارنة ١١ منتج او مستحضر فى Bt.israelensis من خلال ما يزيد عن ١٥٠٠ تحليل حيوى لتقييم ما اذا كان انحدار خطوط الاحتمال متوازية وهى الظروف الضرورية لمقارنة النتائج. لقد وجد الباحثين بوجه عام ان حجم الجسيم ونوع المستحضر يؤثر على انحدار خطوط الانحدار والتى قد تؤدى الى مقارنات غير صحيحة مع المركب القياسى. لقد قام روبرستون واخرون (١٩٩٥) بمقارنة نتائج التحليل الحيوى لبكتريا Bt.tenebrionis ضد L-decemrlinata وباسيلليس كورستاكى ضد بلوتيللا زيلوستيللا ووجدوا ان التركيزات النصفية القاتلة تختلف فيما بين السلالات التابعة لنفس النوع. لقد اشار الباحثون ان الاختلافات الطبيعية قد ترجع الى الاختلافات الاكثر التى وجدت عند مقارنة LC/LD بين السلالات والاهداف مما يؤدى الى استنتاجات خاطئة كأن يقال بتطور المقارنة فى مجموع أفة ما بينما هى لا توجد فى الحقيقة.

يمكن قياس تاثير التغير فى Bt بعدد من الطرق مثل التركيز/الجرعة المطلوبة للقتل (LC/LD50) والوقت اللازم لاحداث القتل (LT50). التركيزات النصفية القاتلة LC50 بالرغم من انها مقياس شائع الا انه فى الغالب يصعب المقارنة بين الدراسات بسبب اختلاف طرق التحليل الحيوى. من الصعوبة مقارنة سمية سلالات Bt دون اعتبار الاختلاف الطبيعى فى حساسية مجموعة الحشرات والاختلافات بين عزلات البكتريا والتداخلات بين هذة العوامل (kinsiger واخرون – ١٩٨٠). قياس وتقييم السمية يمكن ان يتعقد بواسطة كيفية الفعل. تقديرات الكمية

الفعلـية للدلـتا-اندوتوكسينات لكل جرعة او تناول تستخدم احيانا عنه مع الجرعة المقدمـة للحشرة. لقد اقترح بعض الباحثين مقاييس دولية لل LD50/LC والتى قد تكون اكثر ملائمة لبعض انواع حشرات حرشفية الاجنحة والتى تستغرق ايام عديدة حـتي تمـوت وحيـث قد يتسبب الموت من عدوى ثانوية وليس عن الفعل السريع لتوكسـين الباسـيلليس Bt. لقـد اقترح مقارنة الفشل فى انتاج FFD50)Frass) والفشـل فى الوصول للتعذر (PFD50) باستخدام الوزن المكتسب كمقياس للتاثير مـع تعذر الحشرات غير المعاملة. على نفس المنوال اقتراح ليون وايبارا (١٩٥٥) استخدام ED50 باستخدام زيادة الوزن كمقياس للتاثير. لقد وجد الباحثان ان تركيز Bt ومكسـب الـوزن يرتـبطا عكسـيا على الاقل مع الحشرة التى قاما باختبارها ليبتينوتارسا تكسانا.

بالـرغم مـن ان هـذة طـرق ذات قيمة للاستخدام على حشرات خاصة ومسـتوى بحـوث معيـنة فـان LD50 هى اكثر الطرق شيوعا فى قياس كفاءة المنـتجات الصناعية LD50 تمثل مقياس كمي ومن ثم فانة اذا كان المركب (أ) له كفـاءة مـوت تماثل ضعف وحدات المركب (ب) فانة فى التطبيق الحقلى يجب ان تعطـي نصـف كمية (أ) نفس نتيجة المركب (B) كاملة. المقاييس الاخرى للكفاءة نوعـية والعديـد يكشف عن الاختلافات فى التحليل مع حدود ثقة افضل ولكن ليس بهذة النسبة المباشرة.

حساسية الحشرات للباسيلليس:

- لقـد حـاول مؤلفـي هذا الموضوع تجميع قائمة الكائنات التى تستخدم في مكافحتها بكـتريا Bt واختبرت بشكل مباشر او غير مباشر والموجودة فى المراجع. مازالت هذة القوائم غير كاملة ولو انه فى بعض الحالات لم يكن ممكنا سوى الحصول على ملخصات وكانت معظم الدراسات غير منشورة اى مجرد تقارير او سجلات شركات او مجـلات محـدودة التوزيع. من اهم الاصدارات قائمة الحشرات الحساسة لل Bt حـتى عـام ١٩٨٠ (كريج لايجنينسبرش – ١٩٨١) ، والانواع الحساسة للباسيلليس تينبـيريونس (كـيلر و لايجنينسبرش – ١٩٩٣) بينما نشر كالاجهام (١٩٩٨) عن باسـيلليس اسرائيلينسـيز. مازالـت هـناك قليل جدا من المعلومات عن الاصناف السـيرولوجية. فى الحقيقة ان الاصناف السيرولوجية التى وضعت جديثا لم يعرف مـنها وجود كائنات حساسة لهذة العزلات الحديثة التى عزلت من البيئة. لقد وضعت

قـــاعدة معلومـــات تضمنت مقارنة كفاءة توكسينات Bt ضد الحشرات المختلفة مع وصـــف لطـــرق التحلـــيل الحـــيوى والمراجع بواسطة فرانكين هويزن وينستروم (١٩٩٨). ان وضـــع قائمـــة للكائنات الحساسة لبكتريا Bt من الامور الصعبة وهى تحـــدث تشوية عن وضع التوكسينات المتعددة (بما فيها التوكسينات الخارجية) والتى قـــد تنتج بواسطة السلالات داخل مجموعة معينة (صنف سيرولوجى، صنف، تحت نـــوع ... الخ) وعدد المركبات التي تبنى على بكتريا Bt ومدى تنوع طرق التحليل الحـــيوى وطرق التطبيق الحقلى والجرعات المستخدمة. من اهداف هذا الاستعراض المـــرجعى فحـــص التاثـــيرات على الكائنات غير المستهدفة وقد كان معدى القائمة حريصـــين ومتحفظيـــن حيـــث شملت القائمة كل الانواع (صنف سيرولوجى/صنف ماأمكـــن) والـــتى سجل لها حساسية للبكتريا Bt فى هذة الجداول وصفت الحشرات بالحساســـة اذا كانت نسبة الموت بعد المعاملة المعملية بالبكتريا اكبر كثيرا مما فى المقارنـــة او تـتـبعا لـــرأى الباحث من ان البكتريا Bt كانت اكثر سمية بعد المعاملة الحقلية.

- يوجد بيانات متاحة عن القليل من الطرز السيرولوجية خاصة باسيلليس كورستاكى، ايـــزاواى ، ثورينجيســـيز ، جاليريا ، اليستى ، اسرائيلليسيز وريندروليمس/سوتو، تينيبريونس. لقد سجلت Bt كورستاكى فاعلية ضد حشرات ٣١٨ جنس بينما وجدت ١٦٦ جـــنس غير حساسة سواء فى المعمل او تحت ظروف الحقل (جدول ٢-١). بعـــض الاجـــناس الـــتى تحـــتوى انـــواع حساســـة وغير حساسة وضعت فى كلا المجموعـــتان. بالـــرغم مـــن ان الباسيلليس كورستاكى عرفت على انها فعالة ضد حشـــرات حرشفية الاجنحة الا انها اظهرت وسجلت تاثيرات سامة بعدد من حشرات غمديـــة وغشـــائية الاجـــنحة ورتب اخرى. من المثير للدهشة انة لم يسجل طراز سيرولوجى فعالية مفيدة ضد رتبة واحدة من الحشرات.
- الدراســـات المنشـــورة يشـــيع وضـــع قوائـــم اكـــثر عملـــية مبنية على الاصناف الســـيرولوجية/تحـــت الانـــواع مع الفعل الابادى ضد الحشرات مرتبة تبعا للرتبة. مقارنات قوائم الكائنات الحساسة وغير الحساسة اظهرت ان عدد من الانواع يقع فى كـــلا الكائنات بالرغم من انها تتبع نفس الصنف السيرولوجى. لقد وضعت تفسيرات عديدة لهذا الخلط حيث يرجعون الفرق بين الحساسة وغير الحساسة الى الاختلافات بيـــن الســـلالات كمـــا ان التعبيرات التوكسينية تختلف داخل الصنف السيرولوجى الواحـــد. بالاضـــافة الـــى ذلك فان بعض الدراسات استخدمت جرعات مختلفة من

الباســيلليس ســواء علــى صــورة جراثــيم او توكسينات بللورية او مخاليط من المستحضــرات النهائــية بالطــبع فانــة مع التقويم المعملى ينقص الموت مع نقص الجرعة ولذلك فانة مع اختبارات الجرعة الواحدة فان الحساسية تعتمد على الجرعة المنتخــبة الحشــرة قد تظهر عدم حساسية فى جرعة الحقل بينما تكون حساسة مع الجــرعات الــتى اختــبرت فــى المعمل. لقد اسفرت بعض الملاحظات عن عكس الاتجاه. من الممكن حدوث تعريف خاطئ للسلالات وفى بعض الحالات يطلق اكثر من اسم على نفس تحت النوع من Bt (Bt terebrionis).

- يوجد عدد من التباينات التى مازالت فى حاجة للفهم عند تقييم كلا السمية والتاثيرات غــير المســتهدفة للمنــتجات الــتى تعتمد على Bt. يوجد دليل ذو اعتبار مفادة ان الدلتااندوتوكســينات الــتى تنتج بواسطة السلالات المختلفة من Bt تختلف فى مدى النشــاط الابــادى علــى الحشرات وهذا قد يرجع للتعبير المختلف عن التوكسينات الفردية بين السلالات. بالاضافة الى ذلك فانه حتى المستحضرات المعتمدة على نفس عــزلة Bt قــد تخــتلف فــى ســميتها علــى نفس الحشرة. التعبير الخاص بالبيتا اكسوتوكسين يعتبر من العوامل المسئولة عن الاختلاف. بالتاكيد فان المدى العريض مــن النشــاط الــذى يتسبب عن الباسيلليس ثورينجسينز يمكن ان يرجع جزئيا الى التعبير الخاص بالبيتا-اكسوتوكسين ولكن لاى درجة تقوم سلالات خاصة بانتاج كلا التوكســين هــذا مع توكسينات اخرى اقل تعريفا وهذا غير واضح. بعض من هذة النواحى سوف يفحص ويتناول بالتفصيل فى مواضع اخرى من هذا الكتاب.

جدول (٢-١): عدد أجناس الحشرات (الأنواع) الحساسة للأصناف السيرولوجية للباسيلليس ثورينجينسز (الأرقام خارج المربعات) التي سجلت غير حساسة (الأرقام داخل المربعات)

Serovar	Serotype subspecies	Coleoptera	Diptera	Lepidoptera	Hymenoptera	Hemiptera	Isoptera	Orthoptera	Siphonaptera	Thysanoptera	Neuroptera	Plecoptera	Phthiraptera & Ephemeroptera	Trichoptera	Dictyoptera	Total no. genera
1	*thuringiensis*	20(25)	20(31)	190(266)	14(14)	9(11)	2(2)	1	2(2)	1			5(9)		2	266(362)
		26(27)	10(17)	20(22)	22(30)	8(9)	2(4)	7(8)		1	1(2)			1		98(121)
2	*finitimus*		1		10(10)									1		12(12)
			2(5)	6(6)												8(11)
3a3c	*alesti*		3(3)	57(75)	4(4)			1					1			66(84)
			[illegible]	9(10)	5(6)											[illegible]
3a3d	*sumiyoshiensis*		1	[illegible]												[illegible]
			4(4)													4(4)
3a3b3c	*kurstaki*	14(15)	19(33)	234(330)	22(25)	17(18)	2(2)		1	1	1(4)	2(2)	3(6)			318(437)
		28(35)	24(28)	41(55)	37(65)	12(17)	2(2)	1			1	7(7)	12(13)		1	166(224)
3a3d3e	*fukuokaensis*		5(7)	1												6(8)
		1	5(7)	4(4)												10(12)
4a4b	*dendrolimus*	4(4)	6(9)	57(77)	6(6)	2(2)			1	1			2(2)			79(102)
		6(7)	4(7)	9(9)	5(8)	2(3)				1	1					28(36)
4a4b	*sotto*		1(2)	45(56)	3(3)											49(61)
			5(9)	6(6)	3(6)											14(21)
4a4c	*kenyae*	1	3(6)	21(27)									2(2)			25(34)
			3(7)	5(5)												8(12)
5a5b	*galleriae*	4(4)	12(20)	119(175)	6(6)	5(5)	1	1	3(5)		2(4)		3(3)			156(224)
		7(10)	9(14)	10(13)	19(31)	4(5)	1	1		1	1					[illegible]
5a5c	*canadensis*		3(4)	3(3)									1			[illegible](8)
			3(6)	3(3)												6(9)
6'	*entomocidus*	2(3)	4(8)	47(56)	3(3)						1		1			58(72)
		1(1)	4(7)	3(3)	2(2)											10(13)
6'	*subtoxicus*			12(14)									1			11(15)
			1	1												2(2)
7	*aizawai*		2(5)	41(60)		1							2(2)			45(68)
			5(8)	6(6)	1								1			13(16)
8a8b'	*tenebrionis*	42(50)	1	4(5)		3(5)	2(2)	2(2)							2	56(67)
		20(21)	4(4)	8(10)	2(2)	1	1	3(3)			1				1	41(44)
8a8b'	*morrisoni*	1	7(13)	11(12)		1							2(2)			22(29)
		3(3)	4(9)	12(14)												19(26)
8a8c	*ostriniae*			1									1			2(2)
			2(2)	2(2)												4(4)
8b8d	*nigeriensis*			1												1
																0
9	*tolworthi*	2(2)	5(7)	16(18)									2(2)			22(29)
		1	4(7)	4(4)												9(12)
10a'	*caucasicus*			9(10)					1							10(11)
																0
10a10b	*darmstadiensis*	2(2)	9(14)	10(11)									1			22(28)
		2(2)	5(8)	7(7)												14(17)

تابع جدول (٢-١):

Serovar[1]	Serotype/ subspecies	Coleoptera	Diptera	Lepidoptera	Hymenoptera	Hemiptera	Isoptera	Orthoptera	Siphonaptera	Thysanoptera	Neuroptera	Plecoptera	Phthiraptera & Ephemeroptera	Trichoptera	Dictyoptera	Total no. genera
36	*malaysiensis*		3(5)													3(5)
																0
37	*andaluciensis*															0
		1	1	3(3)												5(5)
38	*oswaldocruzi*			1									1			2(2)
			3(3)													3(3)
39	*brasiliensis*		2(2)													2(2)
				1												1
40	*huazhongensis*		2(2)													2(2)
			2(2)	3(4)												5(6)
43	*guiyangiensis*			1												1
		1	1	3(3)												5(5)
44	*higo*		3(4)													3(4)
		1		2(2)												3(3)
47	*wratislaviensis*		2(2)													2(2)
															2(2)	2(2)
	wenguanensis			1												1
		1		2(2)												3(3)
	amagiensis		2(3)	1			1									4(5)
			2(2)	2(2)												4(4)
	tianmensis			3(3)												3(3)
																0
	sooncheon															0
		1	1	3(3)												5(5)
	wuhanensis		1	13(15)									1			15(17)
				1			1									2(2)
	oyamensis	1	2(2)	1				1								5(5)
		1	4(5)	4(4)	1											10(11)

[1] sérovars as listed in Lecadet *et al.* 1999
* *morrisoni* and *tenebrionis* are both H8a8b serotype
† *subtoxicus* and *entomocidus* both serotype 6
‡ *caucasicus* is H10a (see Chapter 2)

تابع جدول (٢-١):

10a10c	*landrina*											0
		1	1	3(3)								5(5)
11a11b	*toumanoffi*		3(3)	4(4)						1		8(8)
			2(6)									2(6)
11a11c	*kyushuensis*		4(7)	3(3)						1		8(11)
			4(5)	4(4)								8(9)
12	*thompsoni*		3(3)	8(8)						1		12(12)
				3(3)								3(3)
13	*pakistani*		1	5(5)						2(2)		8(8)
		1	4(4)	4(4)								9(9)
14	*israelensis*		47(103)	5(5)	8(9)					2(2)	2(2)	64(121)
		21(27)	18(21)	12(12)	1	31(35)		1	1	7(9)	3(5)	77(92)
15	*dakota*											0
			2(2)	2(2)								4(4)
16	*indiana*			3(3)						1		4(4)
			1	2(2)								4(3)
17	*tohokuensis*		2(2)									2(2)
			3(3)	1								4(4)
18a18b	*kumamotoensis*	1	1	2(2)								4(4)
		1	2(2)	3(3)								6(6)
19	*tochigiensis*		2(2)									2(2)
			1	1								2(2)
20a20b	*yunnanensis*		1									1
			2(3)	1			1					4(5)
20a20c	*pondicheriensis*		1	1								2
			[illegible]	1								3(4)
21	*colmeri*			1								1
			2(2)	1								3(3)
22	*shandongiensis*		1									1
		1	4(5)	4(5)								9(11)
23	*japonensis*	6(12)		6(6)								12(18)
			3(4)									3(4)
24a24b	*neoleonensis*		3(3)	2(2)								5(5)
			3(5)	3(3)								6(8)
24a24c	*novosibirsk*			1								1
												0
25	*coreanensis*		1									1
			2(2)	1								3(3)
26	*silo*											0
		1	1	1(1)								3(3)
27	*mexicanus*		2(2)									2(2)
		1	3(3)	3(3)								7(7)
28a28c	*jegathesan*	4(8)										4(8)
												0
29	*amagiensis*		2(3)	1			1					4(5)
			2(2)	2(2)								4(4)
30	*medellin*		3(5)									3(5)
												0
31	*toguchini*			1								1
												0
33	*leesis*		1	2(2)								3(3)
			4(4)	1								5(5)
34	*konkukian*			1								1
		1	2(2)	3(3)								6(6)

الاختلافات فى الحساسية للباسيلليس Bt بين الاجناس:

بالـــرغم مــن انـــنا تناولنا بالتلخيص حساسية الحشرات لل Bt كما هو مذكور فى جدول (٢-١) فانة قد تم استنتاج ان سلالة Bt فردية او منتج فردى ليس بالضرورة ان يكـــون سام لكل الانواع داخل الجنس – مثال ذلك ما وجده Peacock واخرون (١٩٩٨) ان ٤٢ نـــوع (فـــى سبعة عائلات) من حشرات حرشفية الاجنحة المختبرة للحساسية الى Foray 48 B (تكافـــئ ٨٩ BIU/هكتار) كان منها ٢٧ نوع حدث فيها موت. لقد شملت هـــذة الانواع كل بابليونيدى، ٣ نيمفاليدى، كل ٣ ساتيرنيدى، ٥/٧ جيومستيردى، ١٤/٢٦ مـــن نوكـــتويدى. اليمانتريدى الوحيدة التى اختبرت كانت غير حساسة. لقد وجد الباحث.ل. لقـــد استخلافات بين الجنس فى الليثوفين والكاتوكالا مع ٦/٨ نوع من الكاتوتمالا اظهرت حساســـية لمستحضـــر الفوراى. لقد خلص الباحثون الى ان الحساسية للباسيلليس فى حاجة للتقيـــيم حالــــة بحالتها. على نفس المنوال كانت حشرة دودة ورق القطن الصغرى حساسة للباســـيلليس كورســـتاكى ، ايـــزاوايا ، كينـــيا ولـــم تكن حساسة للباسيلليس تولورتى او الثورينجينســـيز (Amonkar واخـــرون ١٩٨٥) بينما كانت حشرة S.frugiperda اكثر حساســـية للســـلالات Bt كينيا ، تولورتى يليها الاصناف السيرولوجية Bt كينيا وايزاويا وكورستاكى. بالنسبة لدراسة اخرى وجد سلامة (١٩٩١) ان معظم المزارع الاكثر فاعلية ضد دورة ورق القطن كانت HD-593 (ايزاويا) ، HD-110 (انتوموسيدى)، HD-263 (Bt كورســـتاتى)، HD-554 (كانادينســـير) مـــعLD50 بلغـــت ٢٢ ، ١٧ ، ٣٦ ، ٣٨ ميكروجرام اندوتوكسين لكل ملليلتر على التوالى مع المقارنة ٢١٦٠ ميكروجرام/ملليليتر ٥، HD-١-١٩ وهو المستحضر القياسى. لقد قام كالفون وبارجاك (١٩٨٥) باختبار عدد مـــن الاصناف السيرولوجية والسلالات ضد العمر الاول من دورة ورق القطن ووجد ان السمية المرتفعة كانت مع السلالات التى تنتمى الى باسيلليس ايزاوليا وكينيا وانتوميسيدى. علـــى العكـــس اشـــارت العديد من التقارير ان انواع Spodoptera لم تكن حساسة لمدى واسع من الاصناف السيرولوجية. خلصت هذة التقارير ان سمية Bt على انواع خاصة من الحشرات لا يمكن التنبؤ بها بشكل دقيق من جراء فحص السمية على الانواع المرتبطة.

الاختلافات فيما بين الصنف السيرولوجى:

فى الغالب يكون نوع واحد من الحشرات اكثر حساسية لاكثر من توكسين او صنف ســـيرولوجى او تحـــت انواع. فى العديد من الحالات يوجد العديد من تحت الانواع نشطة ضد رتبة واحدة خاصة حرشفية الاجنحة حيث ان باسيلليس

Bt aizawai, alesti, anduze, berliner, canadensis, caucasicus, cereus, colmeri, darmstadiensis, entomocidus/subtoxicus, finitimus, fukuokaensis, galleriae, gelechiae, kenyae, kurstaki, kyushuensis, japonensis, morrisoni/tenebrionis, ostriniae, pondicheriensis, shandongiensis, sotto/dendrolimus, subtoxicus, sumiyoshiensis, thompsoni, thuringiensis, tianmensis, tohokuensis, tolworthi, toumanoff, wuhanensis and yunnanensis.

اظهـرت سمية للانواع المختلفة. فى العديد من الدراسات الاخرى اظهرت عزلات مختلفة الاصناف السيرولوجية سمية مختلفة لنفس الحشرة. مثال ذلك يرقات اكياجاناتا التى امكـن مكافحـتها بشكل فعال بواسطة Bt كورستاكى (اكثر سمية على اليرقات) يليها Bt جالـيريا و Bt ثورينجينســيز. فــى المقـابل كانت Bt سوتو، انتوموسيدس، ايزاوايا او الاندوتوكســينات الخاصة بها لوجدها ليست سامة على اليرقات. لقد كانت Bt كورستاكى اكثر تحت الانواع شيوعا التى استخدمت ضد الفراشة الغجرية ليمانتاريا ديسبار ولكن فيما بيـن الاصـــناف الســيرولوجية الاخــرى السامة ضد هذا النوع كانت Bt جاليرى، Bt سبتوكيس، Bt انتيموسيدس اكثر فعالة فى احداث الموت بينما اظهرت الـ Bt ثورينجسيز والليست وسوتو ودندروليمس معدلات موت اقل (Ridet – ١٩٧٣). لقد بلغت قيم التركيز النصفى القاتل LC50 للاجسام الجرثومية المنقاة للباسيلليس سومى يوشينسيز، ذاكوكنسيز، دارمستينيز والجابونسيز على يرقات دودة الحرير تساوى ٧,٣٥، ٦,٤٥، ٣,٠٨، ٢,٦٣ مـيكروجرام لكل جرام غذاء على التوالى مما يوضح ان مستويات السمية تساوى ٥–١٥ مـرة اقـل من السلالة القياسية HD-1 (Bt كورستاكى) (٠,٤٩ ميكروجرام رجم غذاء) (واسـانو واخـرون–١٩٨٨). عـندما اسـتخدمت Bt ضـد هليكوثربا اريبجـيرا وH.punctigera فـى استراليا Bt كورستاكى HD-1 وسلالة Bt كينيا كانت اكثر سمية (LC50 ٤٠ – ٧٠ مـيكروجرام/ملليلتر) وكانت سلالات ايزاويا، كورستاكى HD-336 وجالـيريا ويوهانسـيز ذات سمية متوسطة اما Bt ثورينجينسيز كانت اقل سمية (LC50 ٢١٠٠ – ١١٠٠٠ مـيكروجرام/ملليلتر) و Bt كاناديينسيز غير سامة (LC50 ٢٢٠٠٠ – ٤٤٠٠٠ ميكروجرام/ملليلتر) و(Teakle واخرون – ١٩٩٢).

مـن بيـن ١٢ طراز سيرولوجى اختبرت ضد فراشة الشمع "جاليريا ملليونيللا" لم يكـن هناك ماهو اكثر من Bt جاليريا (طراز وراثى 5a5b). الطرز السيرولوجية 3a3b

(Bt كورســـتاكى)، 3a (اليســـتى)، 4a4b (سوتو)، 4a4c (كينيا) كلها تحتوى على بعض السلالات التى كانت متوسطة الفاعلية ضد فراشة الشمع ولكن 5a5b فقط (Bt جاليريا)و٧ (Bt ايــزاويا) تحـــتوى على سلالات عالية الفاعلية (Jarredt and Bvrges – ١٩٨٢). بالــرغم من ان Bt israelensis هى الشائعة الاستخدام ضد البعوض الا انها ليست تحت الــنوع الوحيد ذات النشاط كتوكسينات ضد البعوض. بعض سلالات Bt كورستاكى تنتج توكســـينات تبيد البعوض ولو انها اقل فاعلية عن Bt اسرائيلينسيز. لقد كانت LC50 ضد الســـلالات الاســـرائيلية وكورســـتاكى ضد بعوض A.aegypti تساوى ٠,٠٥٤ ، ٢١٠ مللجم/ملليلتر على التوالى. وهكذا من الامثلة التى لن اقوم بسردها فى هذا المقام.

الاختلافات داخل الصنف السيرولوجى: Within Serovar Variation

العلاقـــة بين الصنف/تحت النوع لا تستخدم للتنبؤ بكفاءة السلالة (بارك واخرون – ١٩٩٨) حيـــث ان العـــزلات تظهر اختلاف معتبر داخل الطراز السيرولوجى/تحت النوع الفـــردى. من اكثر الدراسات عن سمية العزلات داخل الاصناف السيرولوجية على انواع مـــن الحشـــرات تلـــك التى اجراها دلماج ومعاونوه والتى نشرت بواسطة دلماج واخرون (١٩٨١). لـــم تنشـــر الدراسات كاملة ولكن ملخصات فقط. لقد اظهرت الدراسة ان عمل مجامـــيع بناء على الطراز السيرولوجى يقسم جزئيا مدى سمية العزلات ولكن يظل هناك تبايـــن كبـــير فـــى النشاط وفى الغالب يتراوح من صفر وحتى نشاط عالى فى كل طراز ســـيرولوجى ضـــد حشرة ما. لقد وجد دلماج ان كل طراز سيرولوجى يمكن تقسيم تحت مجامـــيع باستخدام معدل او نسبة النشاط (بقسمة السمية على حشرة/السمية لحشرة اخرى) فى مجاميع متجانسة احصائيا مما يحقق تقسيم جزئى داخل الطراز السيرولوجى.

اوضحت العديد من الدراسات الاخرى اختلافات وتباينات متشابهة فى السمية داخل الاصـــناف السيرولوجية. مثال ذلك عزلات داخل بعض الاصناف السيرولوجية اوضـحت قلـــيل او عدم فاعلية (دراموند واخرون ١٩٩٢). لقد احدثت عزلات مختلفة من باسيلليس كورســـتاكى نسبة موت مرتفعة (اكثر من ٧٥%) ومتوسطة (٢٥–٧٥%) ومنخفضة حتى الصـــفر على هذة الحشرة. لقد قام سايتو واخرون ١٩٩٦ بفحص ١٤٤٩ سلالة تمثل ٣١ صـــنف ســـيرولوجى للكشف عن فاعليتها ضد بعوض كيوليكس بينسيز وفراشة حشرة تى البيبنكيـــتاتس مع عزلات لا تحتوى على صنف سيرولوجى وجدت العزلات ١٢٩٧/١٥٢ ســـامة علـــى الحشـــرة الاولـــى مقابل ١٤١٩/٣٠ للحشرة الثانية وكانت كلها سامة على الحشـــرتان. هـــناك مـــثال اخر يوضح ان الصنف السيرولوجى لا يعكس السمية كما فى

العـــزلة NTB-88 وهـــى عـــزلة من التربة فى كوريا تنتمى H8a8b (Bt موريسونى) ولكـــنها كانـــت غـــير سامة لمدى من حرشفية الاجنحة والغمدية وثنائية الاجنحة بما فيها نوعى البيوجين (Dark واخرون – ١٩٩٨).

سمية دلتا-اندوتوكسين:

تعـــتمد تخصصية تحت انواع Bt على التوكسينات الناتجة ولو ان فصل نشاط كل توكســـين عن المتباينات فى نظم التحليل الحيوى والحشرات ونوع المستحضر او منتج Bt مـــن الصـــعوبة بمكان. تختلف مدى التوكسينات الناتجة بواسطة العزلات Bt بشكل كبير وحـــتى مع الدلتا-اندوتوكسينات والتى تعتمد عليها معظم منتجات Bt الجارية حاليا. سمية Bt tenebrionis كمـــثال يتبنى على التوكسين الفردى Cry 3A بينما Bt israelensis حـــتى 5 cry و cyt توكســـينات توجد فى سلالة واحدة. الباسيلليس كورستاكى من سلالة HD-1 تحـــتوى جينات لعدة بروتينات بللورية: Cry 1 Aa ، Cry 1 Ab ، Cry 1 Ac، Cry 2A ،Cry 2B (Moar واخـــرون ١٩٩٥ – أ ، Lee واخرون – ١٩٩٦). بالرغم مـــن التشابة العالى فى الحمض الامينى الذى غالبا ما يوجد بين بعض من هذة التوكسينات فانها غالبا ما تحدث تاثيرات ابادية مختلفة. حيث ان العديد من التقارير تشير الى استخدام عـــزلة Bt او الســـلالة او تحت النوع فان التاثيرات الفعلية لكل توكسين فردى غالبا غير معـــروفة ولو ان زيادة الاهتمام عن النباتات المهندسة وراثيا التى تعبر عن توكسينات Bt الابادية علـــى الحشـــرات ادت الـــى العديد من الدراسات الحديثة التى تركز على تاثير التوكســـينات الفـــردية. لقـــد قـــام فرانكين هويزن واخرون (١٩٩١) باختبار البروتينات التوكســـينية Cry 1 Aa ، Cry 1Ab ، Cry 1 AC فـــرديا ضـــد يـــرقات التابعة لعائلة تورتريســـيد والـــيماثريدس واللاســـيوكامبيد والنيتلتويد. اختلفت التاثيرات بين الحشرات المختلفة.

جـــدول (٢-٢): امثلة عن مدى نشاط توكسينات Cry 1 ضد حشرات حرشفية الاجنحة

+نشاط ± نشاط قليل - عدم نشاط * لم تختبر

Species	Cry gene							
	1Aa	1Ab	1Ac	1B	1C	1D	1E	1F
Spodoptera exigua	±	±	-	-	+	+	±	+
S. littoralis	-	-	-	-	+	-	+	*
S. exempta'	±	±	-	±	+	±	+	*
Actebia fennica	-	-	-	-	-	-	-	*
Trichoplusia ni	+	+	+	*	+	+	+	+
Heliothis virescens	+	+	+	-	±	-	±	±
Ostrinia nubilalis	+	+	+	*	*	*	+	+
Mamestra brassicae	+	+	-	-	+	-	-	*
Pieris brassicae	+	+	+	+	+	-	-	*
Manducta Sexta	+	+	+	-	+	+	+	*
Choristoneura fumiferana	+	+	+	+	+	+	+	+
Lymantria dispar	+	+	±	-	±	+	-	+
Orgyia leucostigma	+	+	±	-	+	±	-	+
Malacosoma disstria	+	+	+	+	+	+	+	*
Bombyx mori	+	±	-	-	+	+	+	*
Plutella xylostella	+	+	+	+	+	-	-	*
Lambina fiscellaria	+	+	+	-	+	+	+	*
Perlieucoptera coffeella[2]	-	-	+	+	-	*	-	*

التنشيط بين الدلتا-اندوتوكسينات Synergy between Delta-endotoxins

قد استهدفت العديد من الدراسات التداخلات بين توكسينات Cry 1 من سلالة HD-1 لقد اشار الباحث فان فرانكين هويزن واخرون (١٩٦١) ان توكسينات Cry 1 لها تاثير منشط قليل ضد حشرات ليمانتريدس خاصة ليمنتريا ديبار (تستخدم ٢٨ ضعف منفردا عما لو استخدم مخلوطا). فى عام ١٩٩٢ قام تباشنيك باعادة تقييم البيانات واستنتج ان الدراسة السابقة لم تأخذ فى الاعتبار التاثير الكافى بما يوضح التنشيط على الحشرتان كما لم يظهر تنشيط بين توكسينات3Cry 1 A ضد الانواع السبعة من الحشرات. لقد قام Lee واخرون (١٩٩٦) بفحـــص التنشيط بين توكسينات Cry 1 A ضد الفراشة الغجرية وديدان الحرير وقد لوحظ حدوث تنشيط بين Cry 1Aa و Cry 1 Ac مع الفراشة الغجرية (حوالى ٤-٧ اضـــعاف القيمة التى تنبأ بها من تاثيرات التوكسين المنفرد) وكانت العلاقة بين Cry 1Aa و Cry 1 Ab تضـــادية. اوضحت الدراسات المعملية انه عند تخليط الدلتا-اندوتوكسينات

Cry 1Ac و Cry 1 F مــن بكــتريا Bt زادت السمية على يرقات دودة اللوز الامريكية بمقــدار ٢٦ مرة كما اتضح من قيم التركيزات الفعالة (EC50) (Chakrabarti واخرون – ١٩٩٨). لقــد وجــد نفس الباحث عام ١٩٩٢ تنشيط بين توكسين 27-Kda (Cyt1A) وتوكســينات (Cry 4) 150 06 65 – Kda من السلالة الاسرائيلية ضد يرقات بعوض الايبدس اجيتبى (حتى ١٠ امثال زيادة فى الكفاءة) واحتمالات تاثيرات تضادية ضعيفة بين بروتينات ٦٥ ، ٣٠ 1 Kda. لقد تحصل العديد من البحاث على تاثيرات تنشيط من جراء خلــط التوكسينات او البروتينات من Bt مع بعضها البعض.لقد خلص العديد من الدراسين ان استخدام مستحضرات متعددة قد تؤدى الى حدوث تاثيرات اضافية او تضادية وقد تكون التاثيرات غير ذات ارتباط مع سمية الاندوتوكسينات. لقد وجد امين واخرون (١٩٩٨) ان تاثــيرات خلــيط مستحضرات Bt aizawai (Xentari ASR) والكورستاكى (6AFR Dipel كانــت تضادية ضد نفس العائل. لقد كانت Xentari ذات تاثيرات تضادية معنوية على دودة اللوز الامريكية مع المستحضرات الثلاثة للديبيل. لقد حاول Asaro and Hori (١٩٩٥) وAsaro واخرون (١٩٩٥) استخدم الراشح من المزارع البكتيرية لتنشيط الدلتا-اندوتوكســينات ضــد دودة ورق القطن الصغرى. لم يتحصل على هذا التاثير ضد فراشة الحبوب. وجد ان Bt النشطة ضد دودة ورق القطن يمكن تنشيطها بالراشحات من مزارع سلالات غير فعالة ضد دودة ورق القطن مثل Bt japonensis مما ادى الى الاقتراح بان التأثير لا يرجع الى الدلتا اندوتوكسين الذاتى ولكن بسبب عوامل اخرى لم تعرف بعد.

سمية البيتا-اكسوتوكسينات:

يــبدو ان ســمية بعــض الســلالات ضــد الحشرات تنتج من البيتا-اكسوتوكسين (Maciejewska واخــرون ١٩٨٨). ســمية التوكســين الخــارجى ضد الذباب المنزلى والمرتــبط مــع نقــص نشــاط الباسيلليس اندوتوكسينات او مع تحجيم النشاط بعد التعقيم الاوتوكــلا فــى (الاكسوتوكسينات ثابتة حراريا بينما التوكسينات الداخلية تنهار بالحرارة) اســتخدمت لســنوات عديــدة كاختبار للتفرقة بين السلالات عن حدوث الاكسوتوكسينات. البيــتا-اكسوتوكســينات تنــتج بواســطة عدد من تحت الانواع. لقد وضع الباحثان كريج ولانجينــبروش (١٩٨١) قائمــة تحتوى على ما يزيد عن ٧٠ نوع من الحشرات الحساسة للبيتا-اكسوتوكسينات. بالاضافة الى عدد من انواع الافات فان الاكسوتوكسين اوضح تاثير ضــار علــى الحشرات النافعة مثل النحل (كريج ولانجينبروش ١٩٨١). كما سيرد لاحقا

اتضـــح ان الاكسوتوكسين يسبب خطورة على الثدييات حيث كانت الجرعة النصفية القاتلة LD50 بالحقـــن البرتيونى على الفئران تساوى ١٠-٢٠ ميكروجرام/جم من وزن الجسم وحدثت سمية من بعض املاح البيتا-اكسوتوكسينات فى الفراغ حتى مع الجرعات الوراثية (Sebesta واخرون ١٩٨١).

بسبب الاخطار المختلفة على الكائنات غير المستهدفة والثدييات برزت متطلبات فى معظـــم الدول تشترط ان المركبات التى تعتمد على الباسيلليس يجب ان تكون خالية تماما مـــن البيتا-اكسوتوكسينات. هذا بالرغم من ان فى الاتحاد السوفيتى سابقا وغيره من دول الكتلة الشرقية انذاك كانت تستخدم تجهيزات Bt محتوية على التوكسينات الخارجية خاصة تلـــك الـــتى تعتمد على Bt ثورينجينسيز وتم الاعلان عن بعض البيانات عن تاثير البيتا-اكسوتكسينات ضد بعض الحشرات. لقد اظهرت البيتا-اكسوتوكسينات سمية واضحة على العديـــد مـــن انواع الحشرات خاصة ذات الجناحين والاكاروسات والبراغيث. لقد وجد ان البيـــتا-اكسوتوكســـين من باسيلليس ثورينجنسيز كانت سامة لنيماتودا يماثودا تعقد الجذور حيـــث ادت الى قتل ٨٥-٩٥% من اليافعات من العمر الثانى بعد سبعة ايام (Ray and Rana – ١٩٧٩). لقـــد وجد بعض الباحثين ان حوريات Geomris punctipes كانت حساســـة للبيتا اكسوتوكسينات بينما الافات البالغة لنفس النوع لم تتاثر على الاطلاق. يمكن ان يكـــون للاكسوتوكســـينات تاثـــير مـــانع او ضار لتغذية بعض الحشرات (Thomsen واخرون ١٩٩٨).

التنشيط بين بيتا-اكسوتوكسين ودلتا-اندوتوكسين / الجراثيم

تناولـــت العديـــد مـــن الدراســـات تقيـــيم تاثير استخدام كلا الاكسوتوكسين والدلتا اندوتوكســـين و/او الجراثيم من الباسيلليس. لقد اتضح ان استخدام المنتج التجارى المحتوى علـــى الاكسوتوكســـين "Thuringiensin ثورينجنيســـين" مع خليط الجراثيم والبللورات للباسيلليس كورستاكى قد يسبب تاثير اضافى مقوى ضد اليرقات حديثة الفقس للدودة ورق القطن الصغرى (Moar واخرون ١٩٨٦).

لقـــد وجـــد الباحـــثان مـــيلر وهاربر (١٩٨٧) حدوث تنشيط بين الاكسوتوكسينات والديبـــيل ضـــد اليرقات حدوث الفقس (٣-٦ ساعات فى العمر) الحشرة S.Frugiperda خاصـــة عند مستوى تركيزات LC30 لكليهما حيث حققا ١٠٠% موت بالمقارنة بالموت المـــتوقع ٥١%. بعد ذلك وجد جارونر (١٩٨٨) مع نفس الحشرة ان استخدام مخاليط من الاكسوتوكســـينات (مستحضـــر ABG-6162 بمعـــدل ١٢٠-٣٦٠ ميكروجرام/ملليلتر)

ومعدلات LC50 للباسيلليس كورستاكى (ديبسل) ذات تاثير تنشيطى وذلك بداية من ٣-٧ ايـــام وبعـــد ذلك كان ارتباط البيتا-اكسوتوكسينات بالموت مرتفعا للغاية. لقد ظن الباحث Naron (١٩٩٣) ان هـــذة النتيجة تعكس الفعل البطئ للبيتا-اكسوتوكسين والذى عبر عنه بفشـــل الانســـان. لقـــد اوضح Dubois (١٩٨٦) حدوث تنشيط بين باسيلليس كورستاكى HD-1 والاكسوتوكسين ضد العمر الثانى من الفراشة الغجرية.

مقارنة كفاءة او فاعلية مستحضر الباسيلليس:

مـــن الصـــعوبة البالغة مقارنة منتجات Bt للكشف عن الفاعلية ضد نفس الحشرة. المشـــكلة الاساســـية تكمـــن فـــى نقص القياسية فى التعبير عن المواد الفعالة لكل مركب. معـــدلات الاستخدام تختلف ويتم التعبير عن المواد الفعالة على صورة جراثيم/ملليلتر (هذا عديم المعنى فى معظم الحالات) والوزن الجاف (غالبا يشمل مواد التخمر ومن ثم لا تقيس المـــاد الفعالـــة فقـــط) والوحدات الدولية (متاحة فقط لبعض تحت الانواع وتقاس ضد نوع واحد من الحشرات). بهذة المشكلة عن القياسية فان المقارنات التى سنتناولها فى هذا المقام يجـــب ان تعتبر كدليل ارشادى عام. لقد فشلت العديد من الدراسات فى ايجاد اختلافات بين مخـــتلف المستحضـــرات فى المعمل او الحقل. مثال ذلك ما وجده باتى وكاريز (١٩٧٤) عـــندما استخدما الباكتوسبين ، البيوترول ، ديبيل ، ثوروسيد ضد دودة اللوز الامريكية من عـــدم وجـــود فـــروق معنوية فى الفاعلية ضد اليرقات المحصورة فى اقفاص مع نباتات القطـــن. فـــى العديـــد من الحالات اظهرت الانواع المختلفة من مستحضرات Bt تاثيرات مختلفة على الانواع المستهدفة والبيئة. فى بعض الحالات كان لنوع المستحضر (كريات - ســـائل) تاثير كبير على الفاعلية مثال ذلك ما قام به جرانت واخرون (١٩٨٥) من اختبار العديـــد من المستحضرات التجارية للباسيلليس اسرائيلينسيز فى مكافحة البعوض فى الحقل فـــى ولاية كاليفورنيا. لقد اتضح ان محببات الرمل للفيكتوباك الثقيلة مع محتوى قليل من المـــادة الفعالة كانت غير فعالة ضد الكيوليكس ترساليس عندما استخدمت بمعدلات اقل من ٢٨ كجـــم/هكتر. المعلق المائى للفيكتوباك والاعلى تركيزا اعطى ٩٨% موت عند معدل ٠,٥ كجـــم/هكـــتار. بعض الاختلافات فى الفاعلية التى ترجع الى المستحضر قد تنتج من اخـــتلاف ســـلوك التغذية للحشرات المعرضة. لقد تحصل على استجابات مختلفة متشابهة للمستحضـــرات المخـــتلفة بواسطة مور وترمبل (١٩٩٠) اللذان قاما باختبار مستحضرات باســـيلليس كورســـتاكى فـــى مستحضـــرات مخـــتلفة ضـــد الدودة القارضة وقد وجد ان مستحضـــرات المســـاحيق للـــبلل/محبـــبات SAN415,WG354, ABG-6218 لها قيم

تركيزات نصفية قاتلة LC50 منخفضة (٧ ، ٣,٥ مرة) عن الديبيل (٢×) عندما استخدمت بـــنفس المعـــدل مـــيكروجرام/ملليلتر غذاء. المستحضر السائل (SAN415) كان له قيم LC50 اقل من المساحيق القاتلة للبلل ولو ان معدلات التطبيق الحقلى لم توضح.

المستحضـــرات قـــد تختلف فى الفاعلية بين انواع الحشرات. لقد وجد بيرجرجون ومارتوريـــت (١٩٧١) ان مستحضرين ذات نشاط متساو ضد افة دقيق الكرنب يمكن ان يخـــتلفا بشكل عريض فى الكفاءة ضد دودة الحرير حيث اظهرت احد المستحضرات ١٥ مرة اكثر فعالية عن الاخرى. الاختلافات فى الجساسية قد ترتبط بطور الحشرة المختبرة. عـــادة الـــيرقات الصغيرة خاصة الاطوار الاولى تكون اكثر حساسية تحت نفس الظروف عـــن الـــيرقات الكبـــيرة. لقـــد وجـــد موريـــس (١٩٨٦) ان الـــيرقات الصغيرة لحشرة مامستراكونفيجيوراتا كانت اكثر حساسية للديبيل ١٣٢ عن اليرقات العجوزة ولكن الاخيرة كانت اكثر حساسية للثوروسيد LV ٤٨ عن اليرقات الصغيرة. مع اليرقات هيفنتاريا كوينا كانـــت قـــيمة LC50 بعد ٤٨ ساعة تساوى ٥٤١ ميكروجرام/ملليلتر بينما كانت LC50 لمستحضـــر البيوبيـــت (Bt كورســـتاكى) تســـاوى ٤٤٤ ميكروجرام/ملليلتر مع اليرقات المتقدمة فى العمر كان الاختلاف بين الثوروسيد (٢١٣٣ ميكروجرام/ملليلتر) والبيوبين (٤٠٠ ميكروجرام/ملليلتر) واضحا.

قـــد تحـــتوى المنتجات على مخاليط من الطرز السيرولوجية للباسيلليس او جينات التوكســـين والتى توجد عادة فى اثنين من الطرز والانواع السيرولوجية قد تندمج فى عزلة فـــردية مـــن خلال النقل الجينى بالاقتران والذى قد يؤثر على الخطر البيئى ونظامة. لقد اقـــترح من خلال عدد من الدراسات وجود مميزات من جراء استخدام الاندوتوكسينات من اكـــثر مـــن طـــرز ســـيرولوجى او صنف Bt ضد بعض الافات. افات القطن من عائلة noctuid مثل ديدان اللوز ذات حساسية عالية للباسيلليس جاليرى ايزاوايا وكانت الاخيرة اكـــثر فعالـــية بمقـــدار عشـــرة اضـــعاف عـــن الكورســـتاكى ومائة ضعف عن بيرليز (ثورينجنيســـيز) وكلاهمـــا اســـتخدم تجاريا ضد هذة الافات (Frutos واخرون ١٩٨٧). بالـــرغم من ان الباسيلليس كورستاكى فى الغالب تعتبر الاساس والمقياس للمبيدات الحيوية الـــتى تســـتخدم ضد الافات التابعة لحرشفية الاجنحة الا انها ليست دائما الاكثر سمية على الفراشـــات. مـــن بيـــن ســـلالات تم تقييمها ضد يرقات فراشة الصنوبر والفراشة الراهبة والفراشة الشتوية كانت السلالات الاكثر سمية هى Bt سوتو ، ثورينجنيسيز وايزاوايا على الترتيـــب ولـــيس الكورســـتاكى. من الشائع ان تجد عزلات ذات سمية عالية عن منتجات

الباســيلليس الــتجارية المتاحة تجاريا خاصة عندما تختبر سلالات من بين عدد من تحت الانواع (جاريت وبيرنز – ١٩٨٦).

تركيــب التوكســينات والجراثيم ايضا ذات تاثير ملحوظ على كفاءة المنتجات ضد يــرقات بلوتيللا زيلوستيلا. لقد استخدم اسانو وسيكى (١٩٩٤) اربعة مستحضرات تجارية مــتاحة علــى صــورة مساحيق قابلة للبلل وهم باسيلكس (ازاوايا+كورستاكى) ، ثوريسيد (ازاوايــا عــادة Bt كورستاكى) وتفارو–Bt ، الديبيل (كورستاكى) وثلاثة مساحيق قابلة للــبلل تحــت الجريــب وهم KM301 (توكسين بللورات Cry 1Ac والجراثيم الميتة) ، KM202 ، KM302 – Cry 1Ac فــى خلايــا بســيدوموناس المقتولة. لقد اتضح ان المستحضــرات المبنية على توكسينات متعددة وجراثيم ميتة كانت اكثر كفاءة ضد يرقات العمــر الثالــث عــن التوكســين البللورى المفرد فى كبسولات وكان الثوروسيد هو اكثر المستحضــرات الــتجارية ســمية. فــى الغالب لا يوجد سبب واضح عن الاختلافات بين التقارير المختلفة عن المركبات المدروسة. مثال ذلك انة مما يثير الدهشة مع مقارنة نتائج الديبــيل والثوروســيد (فــى اوقــات مخــتلفة وكلا المركبين يعتمدا على سلالة باسيللس كورستاكى HD-1) فان التقارير اشارت الى اختلافات فى السمية على نفس الحشرة تحت نفــس الظروف (Mathur واخرون ١٩٩٤). فى المعمل كان ABG6.05 (كورستاكى) اكثر سمية من الديبيل WP (كورستاكى) والباكتوسبين (Bt ثورينجنسيز) ضد يرقات دودة ورق القطن الاعمار من الاولى وحتى الخامسة ولكن الثوروسيد wp (كورستاكي ايضا) لم يكــن فعالا (Jansens واخرون ١٩٨٤). لقد وجد تاكاكى (١٩٧٥) اختلافات فى الفاعلية بيــن عــدد من المنتجات Bt ضد الحشرات فى اليابان. مثال ذلك ان هذا الباحث سجل ان مستحضــرات Dipel (sic كورســتاكى) و Selectozin (Bt ايزاوايا) كانت فعالة ضد افات الحضر خاصة دودة ورق القطن الصغرى بينما كانت Bt سوتو والثوروسيد A غير فعالة.

من اكثر منتجات الباسيلليس شيوعا على امتداد السنوات الديبيل Dipel الذى تنتجة معــامل ابــوت وشــيكاغو. الديبيل يعتمد على سلالة Bt كورستاكي ، HD-1 وانة بينما المستحضرات تغيرت خلال السنين الا انة استخدم فى العديد من الدول ضد عدد كبير جدا مــن انــواع الحشــرات وقلــيل من الاكاروسات على المستوى التجريبى والتجارى فى المكافحــة. الــرجوع الى قوائم الحشرات والكائنات الاخرى الحساسة او تلك التى تتحمل مستحضــرات الديبيل يوضح تخصص السلالة الضرورية من الباسيلليس كورستاكي تحت

الظـــروف الحقلية. لقد كان الديبيل ساما فقط للقليل من انواع الاكاروسات وحشرات غمدية وثنائـــية ونصـــفية الاجـــنحة ولكـــنها سجلت سمية على ١٧٠ نوع من حشرات حرشفية الاجـــنحة. معظـــم الحشـــرات التى شملتها القائمة ولم تكن حساسة للديبيل هى المتطفلات والمفترســـات ممـــا يعكـــس اهـــتمام الباحثيـــن بينما كانت هناك فاعلية شاملة للباسيلليس كورســـتاكي. بعـــض انـــواع حرشـــفية الاجنحة وضعت فى القائمة تحت الحساس وغير الحســـاس. هـــذا التضارب بين التقارير قد يرجع الى نتائج الدراسات الحقلية حيث سجلت الافـــات المســـتهدفة على انها غير حساسة حيث اظهر الديبيل فاعلية منخفضة كذلك فان الفاعلـــية الفقـــيرة قد ترجع الى بعض العوامل مثل نقص الثبات عنه مع العوامل المسئولة عن الحساسية فى نوع الحشرات.

دور جراثيم الباسيلليس فى موت الحشرات والافات الاخرى:

لقـــد درســـت نســـبة مـــوت الحشـــرات الـــتى ترجع الى جراثيم Bt بالمقارنة مع التوكســـينات. لقد اظهرت بعض الدراسات (Mohd. salleh and Lewis, 1982 B) انه بيـــنما كانـــت التوكســـينات النقـــية او الـــبللورات سامة للحشرات فان خليط من الجراثيم والـــبللورات فى الغالب تعطى اعلى موت. اوضح الباحثان شيسر وبولا (١٩٧٨) سمية جراثـــيم Bt لـــدودة قرون الدخان (ماندوكا سيكشا). بالنسبة لحشرة جاليريا ميللونيللا ادى الاســـتخدام المنفصـــل للجراثيم (مع ٠,٠١% بللورات) وبللورات (مع ٠,٣% جراثيم) من Bt جاللـــيريا ، ايزاوايا و وهانسيز الى حدوث سمية متوسطة بالمقارنة مع مخاليط ١:١. بالاضـــافة الـــى ذلـــك فان طفرة Bt ايزاوايا غير البللورية كانت غير سامة مما ادى الى الاقـــتراح بـــان نشـــاط الجراثـــيم قد يتسبب عن الكمية الصغيرة من البللورات التى تلوث مستحضـــر الجراثيم (اسا واخرون ١٩٨٧). على العكس من ذلك وجد ان البللورات بدون جراثـــيم ميـــتة ذات تاثير قليل. اضافة ٠,١% من الجراثيم الى البللورات زادت من نسبة المـــوت فى ٦٤% من اليرقات من ٣٦% موت مع ٠,٠٠١% جراثيم الى البللورات. هذة النـــتائج مع الجيلاريا ميللونيللا اظهرت اهمية الجراثيم والبللورات كخليط ولم يحدث ذلك مـــع عدد من الافات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة (نافون ١٩٩٣ ، واخرون ١٩٨٧). لقد وجـــد لـــى ولـــيو (١٩٨٩) انه بينما التركيزات العالية من الجراثيم كانت سامة للجلاريا ميللونـــيلا وابـــى دقـــيق امكرنـــب كانـــت توجد كميات كبيرة من البروتين فى الجراثيم والـــبللورات والـــتى لا توجد فى الطفرات والسلالات غير البللورية الغير عنيفة مع هاتين الحشـــرتين مما ادى الى الاقتراح بان هذا يرجع الى وجود التوكسينات الخاصة فى اغلفة

الجراثـيم التى ترتبط بالعنفوانية. اظهر موار واخرون (١٩٨٩) ان المزارع الكلية كانت اكثر سمية عن البروتينات البللورية كراى ١ ، كراى ٢ ، من سلالات Bt كورستاكى فيما عدا التوكسين الداخلى لسلالة HD-1.

الفصل الثانى
تاثير بكتيريا الباسيلليس على الميكروبات واللافقاريات غير المستهدفة

مقدمة: اظهرت الاختبارات المعملية على اللافقاريات ان بكتريا الباسيلليس ذات تاثيرات محدودة على الكائنات غير المستهدفة. بالرغم من المدى العوائلى العريض للعديد من سلالات Bt فانه لا يوجد شك فى ان بعض التاثيرات غير المستهدفة من جراء استخدام بكتريا الباسيلليس سوف تحدث. مثال ذلك ان اكثر من ٣٠٠ نوع من الحشرات حرشفية الاجنحة سجلت على انها حساسة لواحدة على الاقل من سلالات الباسيلليس كورستاكى. لقد خلص الباحثون الى ان معدلات الاستخدام والكائنات المستهدفة من التطبيق والاختلافات الوراثية فى حساسية مجاميع الحشرات ومختلف العوامل البيئية وسلوك التغذية فى الحشرات كلها تساهم فى تقليل التاثيرات غير المستهدفة فى الحقول. دراسات النظم البيئية على حشرات حرشفية الاجنحة اوضحت بعض التاثيرات غير المستهدفة للباسيلليس كورستاكى ولكن هذا لم يكن كافيا للوقوف على خطورة اى نوع تحت التقييم ولم تظهر التاثيرات فيما وراء موسم معين. بكتريا Bt امنة على ديدان الارض والعناكب والنحل عندما تستخدم بالمعدلات الحقلية الا اذا كان المنتج يحتوى على زيادة من التوكسين الخارجى. توكسينات Bt ليست ضارة على النباتات ولو انه فى الامكان ان بعض المستحضرات قد تحتوى على مكونات ضارة على النباتات phytotoxic.

بعد الرش الجوى ونجاحاتة مع هذة الوسيلة الحيوية اصبح هناك مجال كبير لدخول Bt فى المجارى المائية والان تستخدم بعض تحت الانواع (مثل الاسرائيلية) ضد يرقات البعوض ويرقات الذباب الاسود فى الماء. لقد تم فحص عدد محدود من الدراسات للوقوف على تاثيراتها فى المجتمعات المائية وقد وجدت تاثيرات دنيا فقط من Bt اسرائيلينسيز ، تينيبريونيس وكورستاكى. لقد اوضح استعراض عدد من الدراسات عن تاثير استخدامات Bt مع مفترسات وطفيليات الحشرات ان Bt نادرا ما يحدث اضرار. على العكس تم احلال Bt بدلا من المبيدات الحشرية الكيميائية فى برنامج المكافحة الروتينى زادت اعداد مفصليات الارجل النافعة. هذا مع ان المنافسة على العوامل وخفض جودة العائل قد تؤخر بشكل غير مباشر من تطور المفترسات او الطفيليات او تسبب الموت المبكر لها قبل النضج. خلاصة القول ان الباسيلليس تعتبر بوجة عام ذات فائدة كبيرة فى برنامج ونظم السيطرة والادارة المتكاملة للافات.

الوضع التاريخي والمشاكل في الدراسات على الكائنات غير المستهدفة:

الاســتعراض المــرجعي عن التاثيرات غير المستهدفة لاستخدامات Bt تحتوى فى الغالــب على كم هائل من الاستنتاجات والمقولات عن امان رش مستحضرات الباسيلليس وبوجة عام ينظر اليها على انها امنة فى معظم المواقف والظروف ولا يوجد ما يشير الى انها تؤثر على مجاميع الكائنات الحية غير المستهدفة. هذا المنظور يعكس النشاط العريض عن فعالية المبيدات الكيميائية المستخدمة فى وقت الحاجة والتى يتبني على المستوى القليل مــن المعــرفة عــن التاثــيرات علــى الكائنات غير المستهدفة. لقد اخذ فى الاعتبار ان الباســيلليس كانــت ذات تخصصـــية مفيدة على حشرات رتبة حرشفية الاجنحة. فى فترة التسعينات ثار كثير من الاهتمام حول تخصيص الباسيلليس خاصة ما يرتبط بتاثيراتها على الكائــنات الحــية المعرضـــة لاكــثر تحــت الانواع الشائعة الاستخدام هما الكورستاكى والاسرائيلينســيز. التاثــيرات غير المستهدفة ترتبط مباشرة بمدى الحشرات الحساسة. لقد تناول العديد من البحاث دراسة تاثيرات Bt على الانواع غير المستهدفة او الانواع النافعة قــبل المفترســات والطفيليات والنحل وديدان الارض. التاثيرات غير المستهدفة تقاس اما مباشرة بواسطة التقييم الحيوى او غير مباشرة من خلال مستوى النظام البيئى/المجتمع.

هناك عديد من المشاكل والاعتبارات تجابة استعراض التاثيرات غير المستهدفة من الدراســات المرجعية المنشورة. كما نوقش قبلا فان جرعة Bt ترتبط مباشرة بالسمية وقد وجــد ان بعــض الكائـــنات الحساسة مع الجرعات العالية جدا قد تكون غير حساسة مع المعدلات الحقلية. فى حالات اخرى فان الجرعات العالية تؤدى الى تثبيط التغذية حتى فى الكائــنات ذات الــتحمل النســبى. لذلــك فان الدراسات فى حاجة الى التقييم على اساس الجــرعات الحقلــية. هذا ليس ممكنا دائما حيث ان بعض الدراسات استخدمت توكسينات مــنقاه او مستحضـــرات تجريبية او لم تعطى اى اشارة الى الجرعة الحقلية. هناك مشكلة اخـــرى فـــى استقراء التاثيرات مع الكائن الذى يلامس الباسيلليس. فى بعض الحالات فان الكائــنات التى اظهرت حساسية لباسيلليس خاص قد لا يستحب ان تظهر فى نفس المنطقة كافـــة واجبة المعاملة. كذلك فان Bt التى تدخل البيئات مثل المجارى المائية من السريان فـــى معظـــم الحـــالات يحـــدث لهـــا تخفــيف نسبى بالمقارنة بالمستويات المستخدمة فى الاختــبارات. لذلك فان تعريف التاثيرات غير المستهدفة قد تصعب من الدراسات المعملية وحتى من الحقلية كذلك. هذة العوامل فى حاجة للتقييم عند دراسة التاثيرات غير المستهدفة للباسيلليس.

التاثيرات الضارة على النباتات Phytotoxicity:

من النادر ان تجد تقرير يشير الى حدوث تاثيرات ضارة على النباتات من جراء استخدام الباسيلليس. فى تقرير واحد (sharma واخرون ١٩٧٧) تم فيه استخدام البيتا- اكسوتوكسين ثورينجنيسين A وتحت وحدات البروتين دلتا-اندوتوكسين من Bt وقد وجد الباحثون حدوث تاثير خفض فى الانقسام الميتوزى للخلايا المرستيمية فى جذور البصل وهذا قد يرجع الى استطالة الخلايا وطول فترة الجيل. فى المقابل لا توجد تقارير أخرى تشير الى التاثيرات الضارة على النباتات من استخدام الباسيلليس او المنتجات المعتمدة على Bt. التاثير الضار على النباتات تحدث كثيرا مع المستحضرات التى تحتوى على التوكسينات Bt منفردة او خلايا منفردة كما ان بعض مكونات المستحصر قد تكون ضارة على النباتات. لم تظهر تقارير عن التاثير الضار لمعاملات Bt على نباتات الدخان وعلى جودة الياف القطن والمحصول ومحتوى زيت عباد شمس وثمار الافوكادو وتكوين اشطاء البطاطس. لم تظهر ايه تاثيرات ضارة على ما يزيد عن نباتات عديدة فيما يزيد عن ١٠٠ تجربة فى الصوب لقد اشار فالكون (١٩٧٣) ان معاملات Bt لم تتداخل مع فسيولوجى نبات القطن. لقد قطعت اللجنة المنوطة بالتسجيل فى وكالة حماية البيئة الامريكية USA EPA من ان Bt ليس له ايه تاثيرات ضارة على حياة النباتات الارضية ونصف المائية وحتى النباتات المائية كذلك (EPA ١٩٩٨).

الكائنات الدقيقة Microorganisms:

لقد اظهرت العديد من الدراسات تاثيرات تضادية للباسيلليس ضد الكائنات الدقيقة الاخرى. لقد وجد يودينا وبيرتسيفا (١٩٩٧) ان الاندوتوكسين لباسيلليس تينيبريونيس يحدث تاثير حيوى مضاد على ثلاثة من بين اربعة انواع من الميكروكوكاى المختبرة. لقد اشار نفس الباحثان فى نفس السنة كذلك الى النشاط الحيوى المضاد antibiotic activity لتحت انواع الباسيلليس اماجينسيز ونوفوسيبريك ووهانيسنيز ضد بكتريا ميكروكوكس اورانتياكس والاروبيتا كاروتوفورا ، ستربتو مايسيز كريز ومالليس. لقد قام الباحث Visser واخرون (١٩٩٢) بفحص تاثير ديبيل ١٧٦ (Bt كورستاكى) على الكائنات الدقيقة فى التربة وعمليات التحلل. لم يكن هناك تاثير على تنفس الميكروبات والكتلة الميكروبية والعمليات الاخرى مثل تحليل السليلوز مع مستوى المعدلات الحقلية الموصى بها. عندما يستخدم معدل ١٠٠٠ مرة عن المعدل الحقلى زادت معدلات التنفس والكتلة الحيوية بمستويات اعلى عن المقارنة بينما عمليات الفترة وتكوين الامونيوم انخفضت بعد

تحصين ٨ اسابيع. لقد كانت التجارب خلال وقت قصير نسبيا كما انه لا يستحب ان تحدث تغـيرات فـي العمليات الميكروبية بعد استخدام الباسيلليس كورستاكي قد تتسبب بواسطة انـبات Bt وقـد تتسـبب عـن مكونات المستحضرات في المنتج المعتمد علي البترووليم (Visser واخرون ١٩٩٤).

الباسـيلليس اسرائيلينسـيز يمكن ان تجهز في صورة كبسولات دقيقة في تجاويف الـبروتوزوا "تيتراهيمينا بيريفورس" ولو ان هذا كان في مرحلة التجريب الا انها يمكن ان تسـتخدم كوسـيلة قتل لبعوض (Zaritsky واخرون ١٩٩١) في دراسة مبكرة اتضح ان بروتوزوا التربة لم تتاثر باضافة Bt (Casida ١٩٨٩).

اللافقاريات Invertebrates:

كولليمبولا Collembola:

لقد قام اديسون وهولمز (١٩٩٥) بفحص تاثير الباسيلليس كورستاكي (ديبيل ٨ إل، ٨ ايـه أف) علـى كولومـبولا الـتربة candida Folsomia في احدى دراسات النظام المعروف ميكروكوزم. في البداية زادت مجاميع الكولومبولا في التربة غير المعاملة وفي الـتربة الـتي عوملت بالمستحضرات للباسيلليس (Dipel 8L) . التعداد في الميكروكوزم المعامل بالف مثل التركيز البيئي الفعال للمستحضر المبنى على الزيت (Dipel 8L) ظلت مخفضـة جدا خلال فترة التجارب بالرغم من ان المجموع لم ينخفض حتى الصفر في اى مـن المكررات. مع مقارنة تاثير مستحضر به زيت فقط خلص الباحثون الى ان التاثيرات السـالبة مـع هذا المستوي العالى جدا ترجع الى الزيت عنه بسبب الباسيلليس كورستاكي نفسـه. هناك تقنيات عديدة يمكن ان تفسر التاثيرات الضارة لمستحضرات Bt الزيتية على الكولومـبولا مثل التاثير السام المباشر او الخنق Suffocation. اظهرت الدراسات على التوكسـينات المـنقاه ان الجرعات الواطية من توكسينات Bt الاربعة (Cry 1Ab, Cry 1Pc, Cry 2A, Cry 3A) لـم تخفـض من فترة المعيشة او التكاثر في انواع الكولمبولا المختلفة في المعمل.

القواقع والقشريات:-

بوجـة عام فان القواقع والقشريات غير حساسة للباسيلليس Bt مع المعدلات الحقلية باسـتثناء يـرقات مولينـيا بلنترالس. لقد سبب المستحضر التجارى Bt اسرائلينسيز نسبة

مـوت عالية عما حدث مع المقارنات المقتولة بالحرارة مما يجعل من هذا الاختبار حساس جـدا (Gornly واخـرون ١٩٩٦). الدراسات الاخرى التى شملت القواقع لم تظهر سمية للسـلالة الاسرائيلية على القواقع والمحار وبلح البحر. قوائم الكائنات الحساسة التى اعدها تـريج ولانجينـبروش (١٩٨١) اظهـرت ان اوسـتيريا ايميوس ذات الصمامان وغيرها حساسـة للبكتـيريا الاسـرائيلية. البروتيـن المنقى Cry 2A الابادى على الحشرات فى باسـيلليس كورسـتاكى اختـبر ضد واحد من القشريات دون ان يظهر اى تاثير ملحوظ (Sims ١٩٩٧). العديـد من منتجات بما فيها Bitoxibacillin الذى يحتوى على البيتا- اكسوتوكسـينات قـد اختـبرت ضد ثلاثة من انواع القواقع ولم يثبت وجود اى تاثير سام للبكتيريا Bt عليها.

النيماتودا:

النـيماتودا الممرضــة للحشــرات لم يثبت ما يفيد بوجود حساسية مباشرة لها تجاه الباســيلليس. الطـور العـدى الشاب للنيماتودا المرضية للحشرات من اجناس نيوبلاسنتا، سـتينيرينما ، هيتيروابديـتس لـم تحدث له اضرار من جراء المعاملة بباسيلليس سانديجو (ثينبيريونـيس) ، اسرائيلينسيز وكورستاكى (Baur واخرون ١٩٩٨ –b....). لقد عرف مـنذ مـا يـزيد عـن ٣٠ عامـا ان بعض النيماتودا المتطفلة داخليا حساسة للباسيلليس ثورينجيينسـيز (بيـنوك ١٩٩٤). المستحضرات التى تمثل الطرز السيرولوجية للباسيلليس كانت سامة على بعض النيماتودا الرمية حيث تراوحت الجرعة النصفية القاتلة LD50 من ٠,٠٩ وحـتى ٧١ مـيكروجرام بروتين كلى/ملليلتر ولكنها لم تظهر سمية على النيماتودا الـيافعة. فـى نفـس الدراسة اتضح ان بيض ٦ انواع اخرى من النيماتودا (حرة المعيشة ومـتطفلات حيوانية) كانت حساسة للباسيلليس الاسرائيلية مع LD50 تتراوح من ٠,٣٨- ٧,١ ميكروجرام بروتين كلى/ملليلتر. من بين النيماتودا المتطفلة على النباتات كان خروج الشـباب فـى نيماتودا تعقد الجذور صفر عادة عندما كانت كتل البيض تعامل بالثوروسيد بتركـيزات ٠,٢٥-١% (Bt كورسـتاكى) وحـتى بعد ان تنقل الى الماء (كاهال وكاهال ١٩٩٣). بيـنما كانـت السلالة الاسبورجينية من Bt كورستاكى غير فعالة ضد النيماتودا حـرة المعيشـة (.Panagrellus sp) الا انها كانت عالية السمية ضد النيماتودا المتطفلة على النباتات. المستحضرات التى اختبرت قد تكون محتوية على التوكسين الخارجى حيث ثبت ان هذا الاكسوتوكسيد يؤثر على العديد من انواع النيماتودا.

تضاعف نيماتودا عيش الغراب انخفض بشكل معنوى بعد التعرض للتوكسين الخارجي للباسيلليس فى الاسيتون (Cayrol ١٩٧٤). لقد سجل الاكسوتوكسين على انه سم قاتل للنيماتودا تعقد الجذور وغيرها وليس ضد النيماتودا الممرضة للحشرات نيوابلكتانا كاربوكاسبى. لقد اتضح ان الباسيلليس الاسرائيلية تؤثر على نمو مجموع النيماتودا مرة المعيشة Turbatrix aceti (Meadows واخرون ١٩٩٠) كما انها تضعف من أغلفة بيض النيماتودا. لقد تم تسجيل توكسينات الباسيلليس القاتلة للفيماتودا Patented (Narva واخرون ١٩٩١ تحت رقم براءة اختراع واحتكار اوربية Eur.patent 0462721 A2، A.J. Sick واخرون ١٩٩٤ تحت براءة امريكية Us patent 528130 وغيرها). هذا بالرغم من عدم وجود Bt قاتلة للفيماتودا على المستوى التجارى كما انه ليس هناك مركب تحت التطوير. ان ضرورة الاذابة المسبقة للبلورة التوكسين بسبب الحجم الصغير على النيماتودا تحقيق استخدام الباسيلليس ضد النيماتودا.

العناكب Spiders:

لم تظهر التقارير ايه تاثيرات سالبة فى الدراسات على العناكب. لقد تمت دراسة مستحضرين Bt (ثوروسيد 16B وديبيل 4L) على العناكب فى غابات Maine ١٩٨٠ (هليبرن وجيننجز ١٩٨٨). بعد الرش الجوى بالديبيل والثوروسيد بمعدلات ٩,٣٥ ، ٥,٨ لتر/هكتار تم اصطياد ١٢ عائلة ، ٤٢ جنس ، ٦٢ نوع من Araneane فى مصائد مستورة خطية. مقارنة العناكب التى تم اصطيادها قبل الرش وبعد الرش اظهرت عدم حدوث خفض معنوى فى متوسط التعداد من جراء المعاملات بالباسيلليس. فى تجارب الصوب التى استخدمت فيها المعاملة بالمبيدات الكيميائية الحشرية لمكافحة افات حرشفية الاجنحة وتم فيها احلال المبيدات بالباسيلليس زادت من اعداد العناكب. لقد فشلت الدراسات الاخرى العديدة فى اظهار ايه تاثيرات على العناكب بعد معاملات Bt فى الاتحاد السوفيتى سابقا. مستحضر Bt ثورينجيبسيز المسمى Bitoxibacillin استخدم ضد افة اشجار الغابات ديكوميرسي مارجبينيلا فى اوكرانيا ولم يسبب ايه تاثيرات ضارة على عناكب Linyphiid (Zelener ١٩٨٢). العديد من منتجات الباسيلليس Bt (وتحت الانواع) التى استخدمت فى مولدوفا لم تسبب ايه تاثيرات معاكسة على العناكب (Sklyarov ١٩٨٣). العناكب عبارة عن مفترسات اجبارية تتغذى اساسا على الحشرات ومن ثم قد تكون حساسة للتغيرات فى اعداد الافة/الضحية من جراء استخدام الباسيلليس

Bt. فـــي برنامج ميداني في غابات غرب وسط صين ادت استخدامات الديبيل والثوروسيد الى زيادة اعداد وسيادة ووفرة انواع العناكب الناتجة بينما ظلت عناكب القنص دون تغيير. الاعداد الكلية للعناكب بعد الرش لم تتغير بشكل معنوى عما كان الوضع قبل استخدام Bt.

الحشرات والاكاروسات: Insects and Mites

الاكاروسات:

هـــناك قليل من التقارير عن الكائنات الارضية غير المستهدفة اوضحت الحساسية فـــي المعمـــل للبكـــتريا Bt الاســـرائيلية. انواع الاكاروسات اظهرت حساسية للباسيلليس اسرائلينســـيز عندما اعديت في المعمل (Temeyer ١٩٨٤). لقد تم اصدار قوائم بواسطة كـــريج ولانجنبروش (١٩٨١) تشمل عدد من الدراسات التى اظهرت ان الاكاروسات غير حساســـة للباســـيلليس ثورينجســـينز ونفس الحال مع الاكاروسات المفترسة التي ثبت عدم حساســـيتها لتحـــت انـــواع Bt. لقـــد كان هناك استثناء واحد فقط مع الاكاروس المفترس M.occidentalis الـــذى ثبـــت انـــه حســـاس لمستحضر Bt.tenbrionis على صورة مســـحوق قابل للبلل بمعدل ٠,١ ، ٠,٥ ، ١ مرة مثل المعدل الموصى به (٠,٩ كجم مادة فعالة / ٧٥,٧ لتر لكل اكر) (شابمان وهوى ١٩٩١).

الحشرات المائية: Aquatic insects

اظهـــرت العديـــد مـــن الدراســـات حساســـية الحشـــرات المائـــية غير المستهدفة لمستحضـــرات الدايبيل. لم يسبب استخدام الديبيل بالمعدلات الحقلية اى موت علي يرقات الحشرة المائية هيدانوفلاكس ارجيوس. لقد اشار الباحث Kreutzweiser واخرون ١٩٩٢ ان الحشرات المائية من رتب ايفيميروبترا ، بليكوبترا ، تراكوبترا لاتتاثر مباشرة باستخدام الديبيل حتى مع التركيزات العالية (١٠٠ مثل المعدل الموصى به). لقد لوحظ تاثير معنوى (٣٠% مـــوت) فـــي نـــوع واحـــد فقـــط مدربيـــن ١٢ نوع تعرضت لمعدل ٦٠٠ وحدة دولـــية/ملليلـــتر (ذبابـــة الحجر T.nivalis) ولكن هذا التركيز يمثل حافة الامان حيث انه يقـــارب ١٠٠ مـــثل التركـــيز البيئى المتوقع فى ٥٠سم ماء. مجموع ذبابة احجار اخرى Leuctra ternis انخفـــض بشـــكل معـــنوى (٧٠%) بعـــد استخدام Bt كورستاكى للماء المتدفق فى كندا ولو ان التحليل الحيوى باستخدام المادة النباتية لم يظهران Bt كورستاكى كانـــت سامة L. tenius مما ادي الى الاقتراح بوجود سبب اخر. لقد خلص الباحثون الى

عــدم وجود تاثيرات ضارة من مستحضرات Bt على الحشرات المائية. الاستثناء الوحيد كــان مــع الســلالة الاســرائيلية ضــد بعض حشرات ثنائية الاجنحة اساسا من عائلات Culicidre ، Simulidae ، Dixiidae ، Chironomidae وغيرها.

دراسات معملية على حشرات حرشفية الاجنحة: Lepidoptera

بســبب ان العــدد الاكبر من الدراسات على Bt اجرى على السلالات الفعالة ضد حرشفية الاجنحة فان عدد انواع الحشرات داخل هذة الرتبة الذى سجل فى القوائم على انه حســاس للبكتريا Bt كبيرا بشكل واضح. بالرغم من هذا الوضع فان اكثر من ٢٠٠ نوع مــن حرشــفية الاجــنحة ســجلت علــى انها غير حساسة على الاقل لواحد من الصنف الســيرولوجى لبكتريا Bt بالمقارنة بما يقارب ١٥٠٠ تقرير عن الانواع الحساسة للطرز الســيرولوجى للباسيلليس ثورينجسيز. التباين بين السلالة/تحت الانواع يعتبر من العوامل الهامــة التى يجب ان تؤخذ فى الاعتبار مع دراسة التاثيرات غير المستهدفة لل Bt بسبب ان الســمية تعــتمد علــى الاندوتوكســين والاكسوتوكسين.حتى فى داخل جنس واحد من الحشرات فان الاختلافات فى الحساسية داخل الجنس سجلت. الاختلافات فيما بين الاجناس فى الحساسية وحيث فى اجناس كاتوكالا وانواع الليثوفلن حيث سجلت بعض الانواع على انها حساسة والبعض الاخر غير حساس. فى المعمل سببتBt كورستاكى (Foray 48B) مــوت ملحوظة فى ٢٧ من بين ٤٢ نوع من حرشفيات الاجفحة والتى توجد كيرقات فى وقــت الرش لمكافحة الفراشة الغجرية (Pacock واخرون ١٩٩٨). لقد وجد الباحثون ان الاربعــة انواع من ابى دقيق المختبرة كانت عالية الحساسية بالمقارنة بعشرة من بين ٣٨ نــوع مــن الفراشــات. فى بعض الحالات وجد ان الموت يتاخر فى الحدوث مع قليل من مــوت الــيرقات ولكــن لم تستمر ايام الحشرات المعاملة حتى طور الحشرة الكاملة. هذا المــوت المتاخر قد لا يمكن اكتشافة فى تجارب التفرقة الروتينية فى المعمل والتى تؤدى الى تقديرات عن تاثيرات Bt اقل من الواقع.

التاثيرات غير المستهدفة لاستخدامات Bt ذات اهتمام كبير عندما تؤثر على الانواع تحــت الخطــر. ابــى دقــيق L.melissa.samuelis الخطــير كان حساس للباسيلليس كورســتاكى فــى المعمل خاصة مع المعدلات العالية الحقلية (Herms واخرون ١٩٩٧). نوع اخر من ابى دقيق الجميل Danaus plexippus اظهر حساسية منخفضة لل Bt فى المعمل حتى مع ضعف التركيز الحقلى. لقد كانت الحشرة مثار الاهتمام فى الفترة الاخيرة

خاصـــة بعـــد ان نشر Losey واخرون ١٩٩٩ الى ان حبوب لقاح الذرة المهندسة وراثيا الـــتي تعـــبر عن التوكسين على اوراق حشيشة اللبن قتلت حوالى ٥٠% من اليرقات بعد اربعـــة ايام من التغذية.الدراسة لم تحدد بشكل كمي كمية التوكسين التى استخدمت وكانت مـــثار جـــدل كبـــير بسبب قلة التفاصيل. الدراسة التى اجراها Leong واخرون ١٩٩٢ اشـــارت الـــى قليل من الحساسية فى الفراشات البالغة للمستحضر جافيلين Javelin (Bt كورســـتاكى) و MVP (التوكســـين فى الكبسولات) مما ادى الى الاقتراح بان الرش علي مجمـــوع الحشـــرات خـــلال البيات الشتوى يجب تجنبة بسبب قلة الموت المتوقع. لقد قام الباحـــثان هاشن واوبريكي ١٩٩٩ بفحص تاثيرات حبوب اللقاح المهندسة وراثيا على Bt علـــى يـــرقات الحشـــرة بوضـــع حشائش اللبن فى اصص بالقرب من حاقل حلقل الذرة المهـــندس وراثـــيا. ثـــم نـــزع عيـــنات مـــن الاوراق وتعـــرض اليرقات الحديثة الفقس D.plexippus فـــى المعمل. بعد ٤٨ ساعة سجلت نسبة موت ١٩% على اليرقات على الاوراق الـــتى تعرضـــت للقـــاح او حـــبوب لقاح Bt بالمقارنة بصفر موت مع النباتات المـــتحولة. لقـــد اوضـــحت هـــذة الدراســـة ان الفراشة تاثرت عكسيا بواسطة الباسيلليس ثورينجيســـنيز خاصـــة عندما تكون الحشرة فى طور اليرقة. لا يعرف ما اذا كان سلوك الحشرة فى الحقل مثل الحركة بعيدا عن الاوراق الملوثة قد يقلل او يخفف من التاثيرات.

سمية التوكسينات المنقاه للحشرات والاكاروسات:

تخـــتلف ســـمية التوكســـينات المـــنقاه مـــن كل المنتجات التي تعتمد على الجراثيم والـــبللورات. الاندوتوكسينات تختلف فى السمية على مجموعة من انواع حرشفية الاجنحة حيث ان عدد من التوكسينات قد تحدث فى خلية بكتيرية او بللورة فردية. لذلك فان السمية الـــتي تحـــدد لسلالة او عزلة يمكن ان تكون اوسع من التوكسينات المنخفضة عندما ينظر الـــيها بشـــكل فـــردى ولـــو ان التوكسين الذى يتناول قد يكون عالى فى الكمية حيث ان التوكســـين الفردى ينتج بالهندسة الوراثية عنه فى المنتجات. لقد اصبحت الاختبارات على عـــدد مـــن الكائـــنات غير المستهدفة باستخدام البروتينات المنقاه اكثر شيوعا مع التركيز الواضح على استخدام Bt فى النباتات المهندسة والمتحولة وراثيا. مثال ذلك بروتين Cry 2A المـــنقى من باسيلليس كورستاكي اختبر ضد ٣٥ نوع من الحشرات تمثل رتب غمدية وثنائية ونصفية وغشائية ومتساوية وحرشفية ومستقيمة وشبكية الاجنحة والكولومبولا وقد اتضـــح ان انواع حرشفية وثنائية الاجنحة فقط كانت حساسة (Sims ١٩٩٧). لقد استخدم ماكنـــتوش واخـــرون (١٩٩٠-أ) منـــتجات ذات جيـــن منفرد من الباسيلليس كورستاكى

HD-1:Cay1Ab and Hd-73 :Cay1Ac وكذلك للباسيلليس تينيبريوينيس (Cay3A) ضـد الافـات الحشـرية (١٧ نـوع تغطـى ٥ رتـب) والاكـاروس. لقـد وجـد ان L.decemlineata,Chrysomelid فقـط كانـت حساسـة للبروتين Cry3A مع تركيز نصـفى قاتل LC50 يساوى ٦,٥ ميكروجرام/ملليلتر. من الدراسات المثيرة التى استخدم فيها الباسيلليس كورستاكى فى المعمل والتى اظهرت ان بعوض Aiaegypti حساس ولو انـه فى بعض الاحيان كانت هناك حساسية ولكن قليلة (جونسون ودافيدسون ١٩٨٤). لقد اظهـر الصرصـور الالمـانى درجـة منخفضة من الحساسية للباسيلليس كورستاكى فى دراسات اخرى (ساندو وفارما ١٩٨٠ ، زاكويسكي ١٩٩٥).

الانواع النافعة BENEFICIAL SPECIES :

الاعداء الطبيعية Natural enemies:

من الاهمية تقييم تاثير سلالات Bt والتوكسينات الخاصة على الاعداء الطبيعية. فى الغالـب يـتم تعظيم تواجد اقتراب Bt من منظور وزاوية انه بديل امن صديق للبيئة عن المبـيدات الحشرية التقليدية ، هذا بسبب انها تعتبر متوافقة ولو جزئيا مع الوسائل الحيوية للمكافحـة او الوسـائل التى تحدث طبيعيا مثل اشباه الطفيليات والمفترسات (سندو جراس وسـتاديلباكير ١٩٩٤). لقد نشرت الكثير من الدراسات المرجعية عن تاثيرات تحت انواع Bt ومنـتجاتها علـى المفترسات والطفيليات. الدراسات المبكرة التى اجريت قبل ١٩٧٦ والـتى اسـتخدمت فـيها الباسيلليس كورستاكى فى مستحضرات مجهزة فى الحقول وفى وجود المفترسات و/أو اشباه الطفيليات اشارت وخلصت الى عدم وجود صورة كاملة عن تاثـير Bt خاصـة على الطفيليات (Forsberg واخرون ١٩٧٦). منذ ذلك الحين اشارت العديـد مـن الدراسـات الى الامان النسبى لل Bt على المفترسات والمتطفلات فيما عدا التاثـيرات الخاصـة بالتنافس. مستوى تخصص سلالات Bt عادة يعضد هذة الاستنتاجات ولو انه احيانا تسجل بعض حالات الموت غير المستهدفة على الاعداء الطبيعية. لقد قامت مجموعـة العمـل المعنـية "بالمبـيدات ومفصليات الارجل النافعة" التابعة للهيئة الدولية للمكافحـة الحـيوية بفحـص التاثيرات غير المستهدفة لعدد ٤٠ مبيد فى ٦ دول باستخدام طـرق الاختبار القياسية ضد عديد من المفترسات والطفيليات. لقد خلصت المجموعة الى ان الباسيلليس كورستاكى لم تظهر ايه تاثيرات ضارة على معظم مفصليات الارجل وتمت التوصية باستخدامها فى برامج المكافحة المتكاملة (Hassan واخرون ١٩٨٣).

فى العديد من برامج مكافحة الافات لم تظهر استخدامات الباسيلليس Bt اية تاثيرات ضـــارة واضحة على المفترسات والطفيليات. مثال استخدام Bt ضد L. decemdineata فـــى مولدوفا لم تظهر ايه اضرار على معقد الاعداء الطبيعية (بما فيها ٢٦ الخنافس، ١١ ابـــى العـــيد، ٣ اســـد المن) (نوفوزيلوف ١٩٩١). بعد سنوات طويلة من الرش المكثف بالمبـــيدات ثـــم رش بساتين الفاكهة بمستحضرات Bt (باسيلليس ثورينجنسيز – بيتوكسى باســـيلليس، باسيلليس دبندروليمس – دبندرو باسيلليس، باسيلليس جاليريا – اندوباكتيرين، باســـيلليس اليبســـتى – BIP) فـــى مولدوفا حدثت زيادة فى الاعداء الطبيعية مع زيادة فى المكافحـــة الطبيعية للافات (Sklyarov ١٩٨٣). على نفس المنوال عندما استخدمت Bt (بما فيها باسيلليس كورستاكى) لاول مرة فى مكافحة الافات فى بساتين الخضر فى الصين حدثـــت زيـــادة فـــى الاعداء الطبيعية للمن بينما أدي استخدم المبيدات الحشرية الى نقص واضح فى الاعداء الطبيعية (Lu واخرون ١٩٨٦). لقد اتضح ان استخدام BT يتوافق مع الاعداء الطبيعية.

المفترسات الحشرية Insect predators:

المفترســـات الحشرية من الوسائل الخاصة بالمكافحة الطبيعية للافات الحشرية على نفس نسبة المبيدات الحشرية التى لا تضر بالمفترسات. المفترسات فى الغالب تهاجم العديد مـــن الافات الحشرية. لذلك فان اى وسائل مكافحة تخفض اعداء المفترسات قد تؤدى الى حدوث وباء او فوران فى تعداد الافات غير المستهدفة. بشمول واسع وجد ان Bt نادرا ما تحـــدث تاثيرات سامة مباشرة على المفترسات عندما تستخدم بالجرعات الحقلية. الدراسات المرجعية اشارت الى حدوث عدم سمية او قليل من الضرر حيث اتضح ان ٧٠ تقرير فى جملـــة ٨٧ اوضح عدم حدوث ايه اضرار على المفترسات. التقارير الاخرى اشارت الى خفـــض فى اعداء بيض المفترس ونقص فى تناول الغذاء وتاثيرات على نمو ووضع بيض فـــى الحشرات الكاملة وكذلك تاخير حدوث الموت فى الجيل التالى مع جوريات المفترس ونقص الخصوبة وحدوث تاثير تعقيمى مؤقت (Petrova and Khrameeva ١٩٨٩).

لقـــد اتضـــح التاثـــير السام المباشر للباسيلليس تينيبريونس ضد مفترس الاكاروس ميتاســـيلليوس اكسيد نيتاليس (شابمان وهوى ١٩٩١). لقد ثبت ان المعاملة بمسحوق قابل للبلل من هذة البكتريا بالمعدل الحقلى الموصى به ٠,٩ كجم مادة فعالة / ٧٥,٧ لتر/اكر او اقـــل كانـــت اكثر سمية على المفترس من الاكاروس العائل نفسة. لقد كانت السمية عالية عندما تم تجريع اناث المفترسات لمدة ٢٤ ساعة قبل المعاملة وربما يرجع دلك الى شرب

محلــول الــرش. انــاث المفترسات التى استمرت فى الحياه كبيضة وتطورت فى وجود المحلفات لم تظهر اى نقص معنوى فى الخصوبة. انواع الضحية تيترانيكس يورتيكا ليست هــى الافة الكبرى للمحاصيل التى استخدمت عليها Bt تينيبريوينس بشكل تقليدى والتى قد تحــدد من التعرض المفترس لمحاليل الرش ولكنها محدودة الدور كمتغذيات على النباتات والــتى قد توجد عرضيا وفى بعض الاحيان على المحاصيل المعاملة. هناك حالات جديدة اظهــرت فــيها الدراســات المختلفة على نفس المفترس نتائج متضاربة كما حدث مع اسد المديــنة. فــى بعض الحالات قد يكون هناك تاثير غير مباشر لبكتريا الباسيلليس Bt على المفترسات. ابى العيد ذو السبع نقط C. septempunctata حدث به موت ٦٣% عندما وضــع لمــدة ٦ ايام على اشطاء البطاطس مع المتة الذى غمس فى محلول ١% نوفودور (باســيلليس تينيريويــنس) (لا نجينــبروش ١٩٩٣) بينما وجد نفس الباحث (١٩٩٢) عدم حــدوث تاثير غير مباشر على يرقات ابى العيد. اظهرت العديد من الدراسات عدم حدوث ايه تاثيرات او قليل منها على ابى العيد بعد استخدام Bt.

اشباه الطفيليات Parasitoids:

بوجــة عــام فانه عندما تكون الحشرة العائل غير حساسة لبكتريا Bt لا يلاحظ ايه تاثــيرات علــى اشــباه الطفيليات المرتبطة بها (Wysoki واخرون ١٩٧٥، Johnson واخرون ١٩٨٠). استخدامات Bt كورستاكى ضد حشرات حرشفية الاجنحة فى العادة لا يخفض من معدلات التطفل فى الحقل حيث يجعل من ادخال Bt اقتراب ووسيلة تتوافق مع استخدام اشباه الطفيليات وادخالها فى برنامج المكافحة او تلك التى توجد طبيعيا. فى بعض الاحــيان يظهر التحليل الحيوى فى المعمل حساسية منخفضة للبكتريا Bt ونادرا ما يلاحظ هــذا الوضــع فــى الحقــل. لقــد نشر حدوث تاثير مباشر بواسطة حامد فقط ١٩٧٩ مع دياريجمــبا ارمــيلانا ، بمــبلا تورينيولــيلا وغيرها عندما تناولت ١٠^٨ جراثيم/ملليلتر والــبلورات المرتــبطة فى عصارة الغذاء مما ادى الى قتل اشباه الطفيليات. لقد تم الكشف عــن وجود عدد كبير من الخلايا الخضرية لبكتريا Bt ميكروسكوبيا فى هيموليمف ومعدة اشباه الطفيليات الميتة. القليل من اشباه الطفيليات خرج من اليرقات والعذارى للعائل عندما تغــذت اليرقات على اوراق البرقوق الملوثة بالباسيلليس كورستاكى عما هو الحال عندما تغذت على اوراق غير معدية. لقد نشر تقرير واحد يتعارض مع كل الدراسات حيث سجل ١٠٠% مــوت للــترايكوجراما بواسطة دندروباسيلليس (تولستوفا ولونوفار ١٩٧٦) على عدد من العوائل بينما الدراسات كلها لم تثبت ايه تاثيرات جانبية معاكسة.

فـي بعـض الحالات زادت معدل التطفل باشباه الطفيليات بعد المعاملة ببكتريا Bt عندما قورنت بالقطع التجريبية غير المعاملة (Hamel ١٩٧٧، Nealis واخرون١٩٩٢). لقـد اشـار بحاث اخرون الى زيادة وتحفيز التطفل بواسطة ابانتيليس ميلانوسيلليس على ليمانـتاريا رسيبار بعد المعاملة بالديبيل ٤ إلـ بمعدل ١٩,٨ وحدة دولية للهكتار. اليرقات المـتطفل علـيها كانـت ذات اسـتجابة سالبة للضوء ولا تاتى فى تلامس مع الباسيلليس كورستاكى كما فى اليرقات غير المتطفل عليها موجبة الاستجابة للضوء مما يشير الى ان عوائلهـا كانت غير معرضة للباسيلليس كورستاكى. كما هو الحال مع المفترسات اظهرت العديـد مـن الدراسـات عـدم حدوث ايه تاثيرات ضارة على اشباه الطفيليات من جراء المعاملـة بالبكـتريا باسيلليس Bt. هذا بينما تؤدى معاملة العوائل بالباسيلليس الى حدوث تاثـيرات معاكسـة علـى اشباه الطفيليات اليرقية بسبب زيادة موت اليرقات التى مازالت موجـودة على العوائل والتى تحملت المعاملة او بسبب خفض حجم اشباه الطفيليات الباقية (Monnerat and Bordnt ١٩٩٨). اذا كانـت بكـتريا Bt تقتل العائل بسرعة جدا فان شـبية الطفـيل لا يجـد مصدر كافى كى يستمر فى الحياه. مثال ذلك ما يحدث مع دودة البراعم ابانتيليس فورميفيرانيا حيث انخفض التعداد بمقدار ٥٠-٦٠% بسبب نقص خروج الطفيلـيات قبل موت العائل. حدوث خفض فى انتاج البيض وتكوين الشرانق وطول حياه الطفيلـيات البالغة ينتج من جراء تغذية الحشرة العائل بالبكتريا Bt قبل ان تهاجم بالطفيل (سـلامة واخـرون ١٩٩١). التاثـيرات على طول فترة حياه العائل سجلت مع كثير من العوائـل خاصـة خنافس الفول من جراء المعاملة بالبكتريا Bt ولم يثبت ذلك مع ذباب التاكينا.

وسائل المكافحة الحيوية للحشائش: Weed biocontrol agents

حيث ان الحشرات تستخدم كوسائل حيوية لمكافحة العديد من انواع الحشائش يصبح فـــى الامكان ان تؤثر بكتريا Bt على كفاءتها. لقد ظهرت قليل من الدراسات التى تناولت بشـــكل مباشـــر التاثيرات على وسائل المكافحة الحيوية للحشائش. فى اوريجون تم اجراء اختـــبارات علـــى الوســـيلة الحـــيوية Tyria.jacobarae لمعـــرفة حساسيتها للباسيلليس كورســـتاكى. فى تجارب التغذية فى المعمل كانت اليرقات الاولى غير حساسة بينما كانت يـــرقات العمر الرابع والخامس ذات تركيزات نصف قاتلة LC50 تساوى (٠,٣ ، ٠,٢٢ مللـــيجرام مستحضر لكل ملليلتر (ديبيل HG ، كفاءة ٤٣٢٠ وحدة دولية/مللجم). لقد ادت النـــتائج عن التجارب المعملية والحقلية الى الاقتراح بان الباسيلليس كورستاكى قد تقلل من تاثير الوسيلة الحيوية فى جاكوبيا ولو ان استخدام Bt كورستاكى ضد الافات المستهدفة لا يتزامـــن ولا يتوافق مع الاطوار الحساسة للوسائل الحيوية فى المكافحة (James واخرون ١٩٩٣ – b). الوســـيلة الحـــيوية Neochetiona eichhornine ضد ورد النيل لم تكن حساســـة لواحد وعشرين سلالة Bt تابعة لاثنى عشر تحت نوع). البيتا اكسوتوكسين كانت مانعة للتغذية ولكنها غير سامة (Haag and Boucias ١٩٩١). حساسية الحشرات التى تستخدم فى المكافحة الحيوية فى حاجة الى الدراسة من مفهوم كل حالة بحالتها ولكن ليس هـــناك ســـبب للاقـــتراح او القـــول بان وسائل المكافحة الحيوية تكون اكثر حساسية عن الحشرات الاخرى غير المستهدفة.

ديدان الارض Earth worms:

هـــناك قليل من التقارير اشارت الى تاثير بكتريا الباسيلليس على ديدان الارض ولو انهـــا معتبرة لا فقاريات غير مستهدفة فى اختبارات حزم التسجيل مع فرضية عدم وجود ايه تاثيرات (EPA). لقد استخدم الباحثان سميرنوف وهيمبل ١٩٦١ الثوروسيد فى التربة بجـــرعات عالـــية جدا (١٠^{٤} – ١٠^{٥} × مرة اعلى من المستويات العادية ووجدا ان البكتريا Bt قاتلـــة علـــى ديدان الارض L. terrestris اوضحت دراسة لاحقة ان المستحضرات الـــتجارية للباســـيلليس كورســـتاكى (ديبيل) عندما استخدم بمعدلات ٦٠ ، ٦٠٠ ، ٦٠٠٠ مللجم/م٢ (المعدل الموصى به فى الحقل ٦٠ مللجم/م٢) والباكتوسبين بمعدل ٣٠ جم/م٢ لم تخفـــض اعـــداد ديدان الارض فى رماد الغابات بالمقارنة فى الاعداد فى القطع التجريبية الـــتى عوملـــت بالماء فقط (بنز والتريج ١٩٧٥). لقد اجريت تجارب على المستحضرات

الاولـــى من الثوروسيد والتى كانت مبنية على الباسيلليس ثورينجينسيز والتى كانت تحتوى فى الغالب على البيتارا اكسوتوكسين كما هو الحال مع معظم مستحضرات Bt فى امريكا الـــتى كانت تحتوى على هذة التوكسينات الخارجية قبل عام ١٩٧٠. لقد ثبت من التجارب ان الباسيلليس كورستاكى غير المجهزة والديبيل المائى 8AF بتركيزات اكثر ١٠٠٠ مرة من المتوقعة في البيئة لم تظهر ايه تاثيرات معاكسة.

الدراسات فى النظم البيئية Ecosystem studies:

المجتمعات الميكروبية المائية:

لقـــد قـــام الباحـــث Kreutzueiser واخرون (١٩٩٦) بفحص تاثيرات الباسيلليس كورســـتاكى (ديبـــيل) علـــى نشاط المجتمعات الميكروبية على الاوراق فى النظم المائية المصـــغرة microcosms. لقـــد اســـتخدم الباحـــث نوعيـــن من مستحضرات الديبيل (64AF,8AF) مـــع التركـــيز المـــتوقع في البيئة (EEC) بعد الرش بمعدلات من ١٠٠-١٠٠٠ مـــرة مـــثل التركـــيز المـــتوقع. لقـــد اتخذت معايير قياس كثافة الخلايا البكتيرية والـــبروتوزوية والتـــنفس المـــيكروبى والـــتحلل للوقـــوف على تاثير استخدام الباسيلليس كورسيـــتاكى. لقـــد اظهرت الدراسة زيادة فى التنفس الميكروبى بينما نقص التحليل وكان الـــنقص معنويا مع تركيز ١٠٠٠ مثل التركيز البيئى المتوقع (EEC). لقد خلص الباحثون ان الباســـيلليس كورســـتاكى الـــتى تلوث المجارى المائية لا يكون لها ايه تاثيرات ضارة معنوية على المجتمعات الميكروبية.

اللافقاريات:

لقـــد درســـت سمية بكتريا Bt على العديد من اللافقاريات (الاكاروس-النيماتودا-الكولمـــبولا-غشـــائية الاجنحة) التى تسكن التربة وكان الربط بين الجرعة وما يحدث فى الحقـــل نادر التناول وفى العديد من الحالات كانت تحت انواع Bt المختبرة غير مستخدمة فـــى بـــرامج مكافحة الافات فى شمال امريكا (اديسون-١٩٩٣). لقد ادى استخدام الديبيل (Bt كورســـتاكى) فى المانيا الى حدوث زيادة كبيرة فى خروج الحشرات الكاملة من رتبة ذات الجناحيـــن دون ايه تاثيرات سالبة على مفصليات الارجل غير المستهدفة والتى تعيش فى التربة (ويرنك وفونك ١٩٩٥). المصائد التى وضعت تالية لاشجار الدردار في واكوتا اظهرت تاثيرات قليلة من جراء استخدام الباسيلليس على معظم العائلات التى تم اصطيادها مثل ساركو فاجيدى ، كوركسينيسيدى، كاليفوريدى، ستافيلينيدى (Frye واخرون١٩٨٨).

فى الفلبين اظهرت التجارب ان الباسيلليس كورستاكى (ديبيل) ليس له اثر باقى فعال على ١٥ عائلة من الاكاروسات بما فيها اكروسات التربة والاكاروسات المفترسة فى مخلفات الارز المتحللة (Sayaboc واخرون ١٩٧٣). ولو انه فى دراسات اخرى ظهر ان بعض الاكاروسات حساسة فى المعمل. فى اوربا قام Sklodowski (١٩٩٦) بدراسة تاثير المبيدات المختلفة (فوراى-تريبون-ديسيز-ديميلين) فى مكافحة فراشة النن على الخنافس Carabid. لقد وجد انه بينما تقل اعداد الخنافس فى الخريف بعد رش كل المواد مقارنة بالقطع التجريبية غير المرشوشة كان لمستحضر مبيد Foray (باسيلليس كورستاكى) تاثير قليل على مجتمعات الخنافس بشكل شامل. تنوع الانواع كان كبيرا للغاية فى المساحات التى تم رشها بالفوراى. لقد اظهرت تجربة اخرى فى كاليفورنيا ان Bt كورستاكى والزيت احدثت بعض التغيرات فى تعداد عديد من الانواع.

حرشفية الاجنحة:

لقد اظهرت العديد من الدراسات على الباسيلليس كورستاكى حدوث تاثيرات على حرشفيات الاجنحة بعد المعاملة ... بعد استخدام بكتريا Bt فى الغابات اظهرت العديد من الدراسات حدوث خفض معنوى فى اعداد الحشرات الكاملة ويرقات حرشفية الاجنحة فى عام التطبيق مع امتداد بعض الخفض فى السنة التالية وفى الانواع التى حدث فيها استمرار لحياه الاطوار الحساسة فى السنة السابقة لظهور الحشرات الكاملة. التاثيرات التى سجلت كان لها فترة دوام محدودة والتى قد ترجع الى نقص ثبات وعدم تكرار استخدام الباسيلليس فى الحقول. ادى استخدام Bt كورستاكى فى غرب فرجينيا لمكافحة الفراشة الغجرية L. dispar الى حدوث نقص معنوى فى حرشفيات الاجنحة فى عام التطبيق (ستبو واخرون ١٩٩٥). لقد شملت هذة الدراسة حوالى ٩٠ نوع من حرشفيات الاجنحة مع ٢٠٠ من مفصليات الارجل وقد اتضح ان التاثير كان محدودا على حرشفية الاجنحة الموجودة على النباتات وقت الرش. وجد البحاث انه لم يحدث تاثير معنوى على الانواع التى وجدت بعد الرش كما لم تظهر ايه تاثيرات على الانواع غير الحرشفية الاجنحة. تحصل الباحث Wagner واخرون ١٩٩٦ على نفس التاثيرات بعد معاملة واحدة من Bt (٩٠ وحدة دولية/هكتار) على حشرات حرشفية الاجنحة فى غرب فرجينيا فى سنة المعاملة وبعد سنتان من الشفاء. لقد كانت وفرة اليرقات فوق المجموع الخضرى قليلة فى القطع التجريبية المعاملة ولكن الاختلافات كانت غير معنوية عن المقارنة. لقد اشارت الدراسات ان معظم الانواع التى تاثرت شفيت فى السنة الاولى بعد الرش. ثم قياس مدى

انجـراف الباسـيلليس كورسـتاكى فـى يويـا فـى الفترة من ١٩٨٩-١٩٩٣ باستخدام C.sheridanic, I.fotis كدلائـل (Whaley واخـرون ١٩٩٨). لقد اجرى رش جوى بمستحضر ديبيل 6AF المائى بواسطة الطائرة الهليوكوبتر بمعدل ٥٩ وحدة دولية/هكتار. لقد تم تسجيل حدوث وفيات فى حشرات حرشفية الاجنحة التى تغذت على النباتات العوائل الـتى تعرضـت للـرش على بعد ٣٠٠٠ متر من موقع الرش مما يوضح عدم الاهتمام بالتاثيرات غير المستهدفة خارج منطقة الرش.

المجتمعات المائية وفى الاعماق Benthic and aquatic communities:

تاثـير تلوث المجارى المائية ببكتريا Bt من الامور ذات الاهتمام الكبير مع الافات الـتى تهاجم المحاصيل التى تعيش فى المنطقة المحيطة او المغمورة فى الماء. بينما درس الامـان علـى الكائنات غير المستهدفة مع بكتريا Bt اسرائيلليسنيز والتى استخدمت فى المـاء وقد اشارت قليل من التقارير الى امان انواع اخرى من البكتريا على الكائنات غير المسـتهدفة فى الماء. ان تاثير البكتريا الاسرائيلية على مفصليات الارجل غير المستهدفة فـى المـاء يكون محدودا للغاية. الاستخدام طويل المدى للبكتريا الاسرائيلية ضد البعوض (Shnetter واخـرون ١٩٨١) والهـاموش (فـى افريقـيا) (بـرنامج مكافحـة Onchoncerciasis) اظهـر عـدم حـدوث تاثيرات على الحشرات غير المستهدفة. لقد تناولـت الدراسـات العديـدة الاخرى القاء الضوء عن التاثيرات غير المستهدفة للبكتريا الاسـرائيلية ولم تظهر ايه تاثيرات ضارة. لقد اظهرت التجارب المعملية بعض التاثيرات (جارسيا واخرون ١٩٨٠). بعد استعراض العديد من الدراسات إتضح ان مخاطر البكتريا الاسرائيلية كانت محدودة على بعض حشرات Nematocera مثل البعوض والهاموش. لم تكن كل انواع الهاموش حساسة وكان حد الامان كبيرا فى بعض الحالات. لقد وجد ان .C Plu mosus كانـت حساسـة للباسيلليس الاسرائيلية فقط مع جرعات اعلى كثيرا من تلك المستخدمة فى الحقل (Molloy ١٩٩٢). اظهرت يرقات الهاموش حساسية منخفضة وفى بعض الحالات لم تلاحظ ايه تاثيرات على تعداد الهاموش تحت الظروف الحقلية (Miura واخـرون ١٩٨٠). حيث ان السلالة الاسرائيلية تمثل اساس عدد من المنتجات الفعالة ضد حشـرات ثنائية الاجنحة فان الامان لهذة السلالة يعتبر من الاعتبارات الاولية. مع منتجات Bt مـثل الكورسـتاكى وايزاوايا فان تاثير المعاملات على الحشرات المائية لم تؤخذ فى الاعتـبار فـى العديد من الدراسات. لم تظهر كثير من التجارب والملاحظات الميدانية ايه

تاثيرات ضارة. لقد سجلت زيادة فى كثافة الانجراف مرتان عما كان الوضع قبل المعاملة. لقد حدثت تغيرات قصيرة الامد فى تركيب المجتمع ولم يثبت اى تغير معنوى فى التنوع التقسيمى بعد معاملة Bt كورستاكى. لقد حدث خفص معنوى فى ذبابة الاشجار فقط (L.tenuis) بحوالى ٧٠% ولو ان التحليل الحيوى لم يثبت ايه سمية على الزبابة على الاوراق المعاملة بالباسيلليس كورستاكى. لقد اشار الباحثين الى ان الخفض فى تعداد ذبابة الحجر فى الحقل بالرغم من انها لم تكن حساسة فى المعمل قد ترجع الى التداخل مع الوسائل الاخرى والتى تزيد من السمية على هذة الحشرة او الى عوامل اخرى غير معروفة لا علاقة لها بالباسيلليس كورستاكى.

اظهرت بعض الدراسات المبكرة فى كينجزبيرى (١٩٧٥) عدم حدوث ايه تاثيرات معاكسة على الحشرات المائية بعد الرش الجوى ببكتريا Bt كورستاكى فى اونتاريو. مرة اخرى استخدام مستحضرات الكورستاكى بمعدل ٥٠-٥٠٠ وحدة دولية/هكتار لفحص التاثيرات غير المستهدفة فى مستعمرات اللافقاريات المائية (ريتشاردسون وبيرنير ١٩٩٤). الباسيلليس كورستاكى لم تؤثر على الكثافة او تركيب لافقاريات الاعماق بعد سبعة ايام من المعاملة.

استعراض للوضع والرؤى فى وكالة حماية البيئة الامريكية EPA

لقد ثم توصيل البيانات عن حساسية الحشرات غير المستهدفة والتى تحصل عليها من العديد من الدراسات من الشركات الى الوكالة الامريكية US EPA بهدف تعضيد التسجيل. الملخص الذى اعدتة الوكالة على تاثيرات Bt كورستاكى ، اسرائيلليسنيز ، تينيريونيس ، ايزاوايا اظهرت عدم حدوث تاثيرات سامة او قليلة على حشرات غشائية وغمدية وشبكية الاجنحة وغيرها. لقد خلص التقرير ان الدلتا-اندوتوكسين للباسيلليس Bt ليس له ايه تاثيرات ملحوظة على اللافقاريات المائية (المياه العذبة) (EPA ١٩٩٨). لقد سجل التقرير قائمة بالاطوار غير الكاملة والبالغة من العديد من الحشرات مثل ذباب مايو والرعاشات والخنافس والهاموش على انها غير حساسة ولا تتاثر باستخدام Bt. لقد اظهر التقرير سمية عادية (مرجعية الى متوسطة الى عالية على الدافنيا (لافقاريات المياه العذبة) خاصة مع باسيلليس ايزاوايا (جدول ٢-٣). اظهرت قيم التركيزات النصفية القاتلة فثم ما بين ٥٠ وحتى ٥٠٠ جزء فى المليون مما يوضح ان الباسيلليس كورستاكى واسرائيلينسيز متوسطة السمية على الدافنيا بينما Bt ايزاوايا كانت عالية السمية. السمية ترجع لعوامل اخرى بخلاف الدلتا-اندوتوكسين (يفترض ان تكون اكسوتوكسينات). لقد اشترطت التشريعات انه لتحقيق الامان يجب العناية الفائقة بمحتويات البطاقة الاستدلالية وعمليات

الانـــتاج وذلـــك لتفادى الاخطار والاضرار على اللافقاريات المائية (EPA ١٩٨٨). لقد تمـــت الاشارة الى ان اللافقاريات البحرية لا تتاثر كذلك باستخدام مستحضرات الباسيلليس Bt.

وثـيقة EPA ركـــزت الاضـــواء علـــى مشـــكلة واحدة فى مقارنة التاثيرات غير المســـتهدفة لمستحضـــرات Bt: نسبة المادة الفعالة فى المنتجات. معدلات استخدام Bt فى التجارب مدونة فى جدول (٢-٣) : الجراثيم/جم غذاء ، جراثيم/ملليلتر ، جزء فى المليون ppm ، الغـــذاء كجـــزء فى المليون ، مضاعفات المعدل الحقلى ، CFU/g غذاء ، لتر/ CFU ، مللجم او جم/لتر او ميكروجرام/نحلة. بعض هذة المعايير غير ذات معنى خاصة الجراثـــيم/ملليلـــتر (عادة مع ما يصاحبها من البللورات) كما انه فى كثير من الحالات لا تؤثر الجراثيم على السمية. معظم الاصطلاحات لا ترتبط بشكل مباشر مع كمية التوكسين التى تتناول بواسطة الكائنات الحية مثل غير سامة من الناحية العملية.

سمية التوكسينات الخارجية على الكائنات غير المستهدفة:

الســـمية على الكائنات غير المستهدفة لم تظهر مع الدلتا-اندوتوكسين عندما فصلت من وسط النمو البكتيرى (EPA ١٩٩٨). هذا ولو ان عدد من المنتجات البكتيرية Bt من عملـــيات الـــتخمر اختـــبرت مع جرعات عالية واظهرت سمية داخلية على الكائنات غير المســـتهدفة. اظهـــرت بعـــض الدراسات التى استهدفت معرفة المسئول عن النشاط غير المســـتهدف ومـــا اذا كانـــت اعداد المواد الذائبة المقاومة للحرارة التى تلوث المادة الفعالة (البيتا-اكسوتوكسين ثابتة حراريا). لقد حدثت تاثيرات سامة فى برغوث الماء دافنيا ماجنا (قشـــريات دقـــيقة) ونحـــل العسل وبعض الحشرات النافعة والاسماك والثدييات (الجرذان والفـــئران). لقد ثبت ان الدافنيا كانت دليل اكثر حساسية للكشف عن السمية فى الاختبارات السريعة. لقد وجدت المواد السامة فى السائل الرائق المفصول من الدلتا-اندوتوكسينات ولم تظهر اى سمية بواسطة الاكسوتوكسين الثابت حراريا بسبب التخلص من التاثيرات السامة بواسطة التعقيم الاوتوكلافى. لقد وجدت شوائب سامة قد تنهار بالحرارة وقابلة للذوبان فى مستحضـــرات Bt كورســـتاكى وايزاوايا واسرائيلينسيز وقد توجد فى اصناف اخرى. لقد اظهرت منتجات Bt ايزاوايا تاثيرات سالبة كبيرة على الكائنات غير المستهدفة.

جـدول (٢-٣): الحساسية غير المستهدفة: ملخص البيانات التى ارسلت للوكالة EPA بغرض التسجيل NOEL (مستوى التاثير غير الملحوظ)، NOEC (التركيز الذى لا يحدث تاثيرات ملحوظة، nontoxic غير سام، toxic سام).

Organism	Bt subspecies	Result
Predaceous Neuroptera	Kurstaki	NOEL = 3000 ppm Practically nontoxic at $1X10^8$ cfu/g food for 9 days; NOEL = $1x10^8$ spores/g doet Practically nontoxic at $1.2X10^8$ cfu/g food for 9 days; NOEL = $1.2x10^8$ spores/g doet Slightly toxic; 10X field rate resulted in 18% mortality
Parasitic Hymenoptera	Kurstaki	Practically nontoxic at 3000 ppm of food for 15 days; NOEL = 3000 ppm Practically nontoxic at $2.4X10^8$ spores/ml diet for 23 days; NOEL > $2.4x10^8$ spores/ml diet Practically nontoxic at $1X10^8$ spores/ml diet for 30 days; NOEL > $1x10^8$ spores/ml diet
	Israelensis	30-day LC_{50} > $7.9x10^7$ CFU/G DIET
	Tenebrionis	NOEL = 100 ppm
Predaceous Coleoptera	Kurstaki	NOEL = 1500 ppm, slightly toxic Practically nontoxic at $2.4X10^8$ spores/ml diet for 28 days; NOEL > $2.4x10^8$ spores
	Israelensis	9 day LC_{50} $1.8x10^8$ cfu/g diet
	Aizawai	NOEL = 10.000 ppm & NOEL = 1566 ppm
Aethropod predators and parasites	Kurstaki	Slightly toxic (6.2 g/l resulted in 12-21% mortality) Toxic; 10X field rate resulted in 100% mortality within 6 days
Honeybee	Kurstaki	48-hour LD_{50} > 23.2 mg/bee; NOEL = 7.7 mg/bee 48-hour LD_{50} > 23.2 mg/bee; NOEL = 7.7 mg/bee 10-day LC_{50} 118 mg/bee (consumed) No significant effects noted at 10X field rate
	Aizawai	Highly toxic; LC_{50} = 15 ppm
	Israelensis	5 day LC_{50} > $7.0x10^7$ cfu/g diet
	Tenebrionis	NOEL = > 100 ppm (100X field conc.) in 18 da test
Green lace-wing larvae	Israelensis	16 day LC_{50} > $1.5x10^8$ cfu/g diet; 16 day NOEL = 2.5 x 10^4 cfu/g
	Aizawai	NOEL = 10.000 ppm & Toxic to larvae at 10X field rate
Earthworm	Tenebrionis	NOEC = > 100 ppm (120X in 1 kg soil) in 14 day test
Predatory mite	Aizawai	1X field rate resulted in 24% corrected mortalty
(freshwater invertebrate)	Kurstaki	Moderately toxic; 21 day LC_{50} is between 5 ppm and 50 ppm & Aqueous LC_{50} > 4.9 ml/l
	Israelensis	Moderately toxic; 21 day LC_{50} is between 5 ppm and 50 ppm
	Tenebrionis	48 hour EC_{50} > 100 mg/l
	Aizawai	Highly toxic; 21 day NOEC = $6.4x10^8$ cfu/l

الفصل الثالث

تاثير الباسيلليس على الفقاريات Effects on Vertebrates

مقدمة: اظهرت الدراسات المعملية عن الامان على الفقاريات خطر قليل جدا من جراء التعرض المباشر للباسيلليس. اتضح ان Bt قليلة السمية جدا على الاسماك والبرمائيات. لم تشير التقارير او الدراسات الى حدوث تاثيرات مباشرة على عدد من انواع الطيور سواء فى المعمل او بعد الاستخدام الحقلى. التاثيرات غير المباشرة على الطيور اكلة الحشرات وبعض الثدييات الصغيرة تشمل التغير او التحول فى الطعام. خفض مجاميع حرشفية الاجنحة بعد التطبيق الميدانى الحقلى للباسيلليس ادت الى تقليل عدد العشوش التى تبنيها الطيور فى بعض الانواع ولكن هذا التاثير لم يصل الى تقليل عدد الفراخ فى كل منطقة توالد فى نفس سنة استخدام البكتريا او فى السنوات المتتابعة. لقد ادى الاستعراض المرجعى عن سمية بكتريا Bt على الثدييات بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA إلى الاستنتاج بعدم حدوث تاثيرات معاكسة فى دراسات السمية الحادة على الثدييات الصغيرة. بعد التجريع الفمى والرئوى كانت الجراثيم تخرج او تصفى من الحيوانات بسرعة جدا بدون حدوث ايه تاثيرات معاكسة. لقد لوحظت بعض الوفيات فى الفئران بعد الحقن البريتونى بالجرعات العالية ($١٠^{٨}$ cfu/حيوان) ولكن نفس السلالات اظهرت عدم سمية مع الجرعات الواطية $١٠^{٧}$ cfu/حيوان او اقل. اظهرت مقارنات الجرعات العالية من البكتريا عدم وجود سمية كما فى الباسيلليس سبتيليس والتى قد تسبب موت اذا استخدمت مع جرعات تزيد عن $١٠^{٨}$ cfu/حيوان.

بالرغم من الاستخدام الواسع ولسنوات طويلة للمنتجات المبنية على الباسيلليس وجد قليل من الارتباط مع المشاكل الصحية فى الانسان وقد سجل ان حالات العدوى السريرية ببكتريا الباسيلليس فى الانسان نادرة الحدوث بشكل يلفت للنظر. لقد سجلت حادثتان فى الصحة المهنية بسبب التعرض للباسيلليس مما ادى الى حدوث حالات مرضية استدعت العلاج بالمضادات الحيوية. لقد امكن استرجاع عزلات Bt من المرضي ذوى الجروح شديدة الحرق ولكن هذة العزلات كانت مختلفة عن تلك التى استخدمت فى التجهيزات التجارية. اظهرت دراسات السمية التى اجريت حديثا على الطرز السيرولوجى Bt تونكوكيان ان بعض العزلات على الاقل فى نظام النموذج المناعى فى الفئران قد تحدث عدوى وتتكرر مشابه لما يحدث مع B. cerens. استكشاف المزارع الصحية والبكتيرية

المجموعة روتينيا فى المجتمعات المعرضة للباسيلليس اثارت العديد من الاهتمامات. حيثما تـم اسـترجاع بكـتريا Bt مـن المرضى والمصابين فانه لا يمكن الجزم بانها هى سبب المرض.

انتاج التوكسينات المعدية المسببة للاسهال فى الباسيلليس سيريوس بواسطة عزلات Bt أثار الانتباه والاهتمام بان Bt قد تسبب امراض معدية فى الانسان gastroenteritis. لقـد اجريـت قليل من الدراسات حديثا واوضحت ان بعض سلالات Bt بما فيها تلك التى وجدت فى العديد من المستحضرات التجارية قادرة على انتاج التوكسينات المعدية المسببة للاسـهال ولكـن بمسـتوى اقل عشر مرات لما يحدث مع سلالات B. cereus. لقد ادت الادلـة المـتوفرة فـى الوقت الراهن الى الاقتراح بعدم حدوث تسمم غذائى بسبب التلوث بالباسـيلليس حيـث ان الظـروف الملائمة لانتاج التوكسينات غير متوفرة فى المنتجات التجارية كما ان نظام التوكسين المعدى الذى ينتج بواسطة معظم السلالات منخفضة. حتى الان لا يوجـد دلـيل صالح للربط بين استخدام Bt مع كوارث الاسهال بعد تناول الطعام. لذلـك فانـه من الحكمة اجراء اختبارات الغربلة على السلالات الفعالة والتجارية للوقوف علـى مقدرتهـا علـى إنتاج التوكسينات المعدية. لقد تم تطوير نظم عديد ة للتقييم الحيوى للكشـف عن التوكسينات المعوية فى بكتريا B. cereus. بوجة عام اتضح ان الباسيلليس لـيس لهـا ايـه مخاطر على الفقاريات. اذا اخذنا فى الاعتبار الاستخدامات المكثفة التى اجريـت فعلا على Bt فى مكافحة الافات وكذلك الحدوث الطبيعى فى البيئة فان احتمالات العدوى على الادميين نادرة مما ادى الى الاقتراح بقلة المخاطر.

الاسماك والبرمائيات:

الدراسـات القلـيلة الموجودة فى المراجع تناولت تحديد تاثيرات Bt ضد الاسماك باسـتخدام Bt اسرائيللينسيز فى مستحضرات متعددة والتى استخدمت فى المياه مباشرة. لم يثبـت وجـود تاثيرات على السمك الموجود خلال المعاملة ولا حتى فى تجارب التعرض المباشـر (جـدول ٢-٤). لم يؤدى استخدام الباسيلليس ثورينجسيز ضد الذباب الاسود فى ميتشـجان ايه تاثيرات على الموت او على زيادة الوزن لاسماك لركباس او اعداد وانواع السـمك (Merritt واخـرون ١٩٨٩). اظهـرت الدراسـات المعملـية الـتى اجـراها Christensen ١٩٩٠ أ،ب،ج عدم وجود تاثير معاكس للباسيلليس الاسرائيلية على السمك الشمسـي ذو الخياشـيم الـزرقاء والسـلمون عندما تعرضت لتركيز ١,٣-١,٧ × ١٠^١٠ cfu/جـرام غـذاء. عـند مقارنـة سـمية المـواد القاتلة للبعوض المختلفة على اسماك

F.heteroclitus اتضح ان الباسيلليس الاسرائيلية هى الاقل سمية بين المستحضرات الخمسة التى اختبرت (Lee and Scott ١٩٨٩). الجدول (٢-٥) يوضح ان الفينوكى كارب والباسيلليس ثورينجنسيز معا كانت اكثر عن الفينوكى كارب منفردا مما ادى الى الاقتراح بان استخدام مخاليط من وسائل المكافحة يجب ان يفحص بعناية. لقد كان Bt تينيبريونيس غير سام على السمك L. reticulata (Mayer ١٩٨٩).

اوراق التسجيل التى تجرى وتورد الى وكالة حماية البيئة الامريكية EPA شملت العديد من تحت الانواع مثل الباسيلليس كورستاكى ، تينيبريونيس ، ايزاوايا واسرائيلينسيز (جدول ٢-٦). التركيز النصفى القاتل LC_{50} يتراوح من اكثر من ٨,٧ × ١٠^٩ وحتى اكثر من ٤,٦ × ١٠^١١ CFU / لتر حيث لم يثبت حدوث اى سمية او حالة مرضية فى الاسماك الموجودة فى الاختبار.

جدول (٢-٤): انواع الاسماك التى سجلت على انها غير حساسة للباسيلليس ثورينجبنسيز فى التحليل الحيوى فى المعمل او بعد التعرض الحقلى.

Fish species	Common name	Reference
Gambusia affinis	Mosquito fish	Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980
Lucania parva	Rainwater killifish	Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980
Gasterosteus wheatlandi	Twospine stickleback	Abbott Laboratories; Garcia et al. 1980
Lapomis marcrochirus	Bluegill	Christensen 1990a
Salvelinus fontinalis	Brook trout	Wipfli et al. 1994
Salmo trutta	Brown trout	Wipfli et al. 1994
Oncorhynchus mykiss	Rainbow trout	Wipfli et al. 1994; Christensen 1990b
Pseudomugil signifer	Pacific blue-eye fish	Brown et al. 1998
Poecilia reticulata	Larvivorous fish	Mittal et al. 1994
Tilapia nilotica		Lebrun and Vlayen 1981
Esox lucius		Becker and Margalit 1993
Cyprinus carpio		Becker and Margalit 1993
Perca fluviatilis		Becker and Margalit 1993
Ambloplites rupestris	Rock bass	Merritt et al. 1989
Epiplatys sp.	Killifish	Beck 1982
Cyprinoidei	Goldfish	Beck 1982
Cyprinodon variegatus	Sheephead minnow	Christensen 1990c

جدول (٢-٥): السمية الحادة لمبيدات مكافحة يرقات البعوض على F. heteroclitus

Insecticide	Mean 96h LC_{50} (mg/l)	95% confidence limits (mg/l)
Temephos	0.04	0.02-0.05
Fenoxycarb	2.14	2.01-2.27
Diflubenzuron	32.99	29.01-37.52
Methoprene	124.95	90.01-171.64
VectoBac (Bt israelensis)	980.00	730-1330
Fenoxycarb/VectoBac	1.55	1.40-1.72

جدول (٢-٦): الحساسية غير المستهدفة للاسماك

Fish	Bt subspecies	Result
Trout	Kurstaki	$LC_{50} > 1.5 \times 10^{10}$ cfu/l Practically non-toxic; aqueous $LC_{50}>4.9$ ml/l and oral $LC_{50}>2.5$ nl/g of food Practically non-toxic; with an aqueous $LC_{50}>4.6 \times 10^{10}$ cfu/l of dilution water
	Israelensis	Aqueous $LC_{50}>8.7 \times 10^{9}$ cfu/l; oral $LC_{50} > 1.7 \times 10^{10}$ cfu/g food. Slightly toxic Aqueous $LC_{50}>1.4 \times 10^{10}$ cfu/l; oral $LC_{50} > 5.3 \times 10^{9}$ cfu/g food.
	Tenebrionis	Aqueous NOEC = 100 mg/l
	Aizawai	Aqueous $LC_{50}>3.9 \times 10^{7}$ cfu/l; oral $LC_{50}>1.5 \times 10^{10}$ cfu/g food 96 hour $LC_{50}>100$mg/l
Bluegill	Kurstaki	Practically non-toxic at 1.5×10^{10} cfu/l of dilution water and at 1.2×10^{10}cfu/g of food for 32 days
	Israelensis	Aqueous $LC_{50}>8.9 \times 10^{9}$ cfu/l; oral $LC_{50}>1.3 \times 10^{10}$ cfu/g food Aqueous $LC_{50}>1.6 \times 10^{10}$ cfu/l; oral $LC_{50}>4.3 \times 10^{9}$ cfu/g food

اظهرت التقارير من منظمة الصحة العالمية WHO (١٩٩٢) ان الدراسات المعملية والحقلية على تاثير الباسيلليس Bt على الضفادع وسمندى الماء والسمندر والسمك العلجومى وقد اتضح عدم حدوث تاثير للباسيلليس ثورينجسيز على انواع البرمائيات المختبرة (جلير وكالجهان ١٩٩٨) وكانت Xenopus laevis غير حساسة للباسيلليس تينيير يونيس (مايو ١٩٨٩).

الطيور:

اذا تكلمنا عن التاثيرات المباشرة نقول انه لم تسجل ايه سمية تذكر من جراء استخدام سلالات Bt على اى من انواع الطيور. اوضحت الدراسات المكثفة على الطيور مع الجرعات العالية من Bt الاسرائيلية غير الذائبة على صورة جراثيم وبلورات عدم حدوث ايه تاثيرات معاكسة (Meadows ١٩٩٣). لقد وجد Lattir واخرون (١٩٩٠ أ،ب) عدم وجود سمية او مرضية او فقد فى الوزن عندما اعطيت Bt الاسرائيلية عن طرق الفم بجرعات كبيرة (٣,٤ – ٦,٢ X ١٠^١١ cfu / كجم / يوم لمدة ٥ ايام الى العصفور البنى الصغير "كولينس فيرجينيانس" والبط البرى. اظهرت دراسات اخرى على العصافير وغيرها عدم حدوث تاثيرات معاكسة من المعاملة الفمية للباسيلليس ثورينجنسيز كما استرجعت بكتريا حية غير مهضومة من البراز. لقد خلصت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA الى ان تحت انواع Bt كورستاكى ، الاسرائيلية ، تينيبريونيس والايزاوايا ليست سامة او مرضية على البط والعصافير بعد الاختبارات الخاصة بالسمية الحادة وتحت الحادة. لقد تراوحت التركيزات النصفية القاتلة LC_{50} بالباسيلليس ايزاوايا من ٨– ١٦ جم/كجم لهذين النوعين من الطيور. لقد سجلت السلالات كورستاكى وايسرائيلينسيز علـى انها غير سامة عمليا بجرعات تتراوح من ٢,٥–٣,١ جم/كجم/يوم عندما اعطيت للطيور لمدة ٥ ايام. لم يسجل حدوث موت بعد حقنة ٣ مللجم/كجم من Bt تينيبريونيس فى البط – لم تسبب Bt الاسرائيلية ايه تاثيرات ومواضع ضرر علي الفراخ البياضة والفئران فى الجانب الاخر تم استكشاف الموت فى الطيور بعد استخدام المبيدات لسنوات عديدة فى مكافحة الاصابات الوبائية لفراشة L. monacha فى الدانيمارك. بالرغم من ان مبيد الاندوسلفان حقق مكافحة جيدة (٦٠–٩٧%) الا انة سبب كذلك بعض الموت فى الطيور بالمقارنة بالدييل (كورستاكى) الذى اعطي مكافحة ضد الافة ٧٦% فى طور اليرقات ولكنة لم يسبب اى موت فى الطيور (Bejer ١٩٨٦).

اذا تكلمنا عن التاثيرات غير المباشرة نقول ان اى تاثير لبكتريا Bt على الطيور اكلة الحشرات تتسبب عن نقص امداد الغذاء ولم يوجد تاثير سام مباشر. الطيور التى تغذت على الديدان فى الربيع حدث ان لاقت عدد قليل من الضحايا التى تتغذى عليها لفترة قصيرة وهذا ما يدفع الطيور للبحث عن غذاء بديل. كذلك فان عدد محاولات التعشيش فى السنة قد تقل ولكن هذا لا يؤثر بالضرورة على عدد الفراخ فى كل منطقة تكاثر فى السنة استخدمت فيها Bt والسنوات التالية (RED-EPA ١٩٩٨). فى دراسات خاصة تم تسجيل

قليل من التاثيرات غير المباشرة. لم يتاثر سلوك وتكاثر الذباب النبرية (تعيش يرقاتها تحت جلـد ظهـور الماشية والخيل وتسبب الانتفاخ النبرى) باستخدام الباسيلليس Bt الفعال ضد حرشـفية الاجـنحة ولو ان العشوش فى القطع التجريبية المعاملة كانت بها حضنة اصغر ومعـدلات فقـس اقل وحقنة اقل ولكن بشكل غير معنوى (Holmes ١٩٩٨). لقد خلص الباحـث الى حدوث تاثيرات غير مباشرة ذات مخاطر قليلة عن الطيور المفردة باستخدام الدنروباسـيلليس بمعدل ٢,٥ كجم/هكتار فى غابات البلوط لم تؤثر معنويا على غذاء طائر الزرزور. بالرغم من ان مكون الغذاء يحتوى على نسبة عالية من الافات (٥٥% تقريبا). لقـد درس تاثير الرش ديبيل والعذارى والباكتورسبين على مجموع الطيور فى اسبانيا ولم يحـدث سـوى نقـص بسيط ومؤقت فى التعداد. لم يؤثر استخدام الباسيلليس الاسرائيلية (مجـبات الفيكتوباك) فى جملة مكافحة البعوض على ١٩ نوع من الطيور. بالطبع حدثت بعـض التاثـيرات فـى بعض الدراسات بسبب تاثير البكتريا على كتلة الغذاء من يرقات حرشفية الاجنحة التى تتغذى عليها الطيور. فى بعض الحالات تدفع الطيور لتغيير عوائل التغذية.

تاثير مستحضرات الباسيلليس على الثدييات:

تاثير الباسيلليس Bt على الثدييات الصغيرة:

١- ملخـص للتقيـيم الخـاص بالامـان على الثدييات الصادرة عن وكالة حماية البيئة الامريكية EPA

لقـد اعدت وكالة EPA قاعدة بيانات تاريخية عن Bt واسترجعت فى ملخص عن السمية على الثدييات من خلال الدراسات التى نشرت نتائجها بواسطة الباحثين فى الوكالة. لقـد اشـارت الوثائق التى صدرت عن الوكالة فى مارس ١٩٩٨ انه لم يثبت ايه تاثيرات صـحية علـى الثديـيات فـى اى من دراسات العدوى/المرضية. دراسات السمية الحادة اظهـرت خمسـة اماكن للتعرض بما فيها الدخول عن طريق الوريد والتى تسبب اقصى خطـر. لم تظهر دراسات السمية الحادة عن طريق الفم (جرعة واحدة كبيرة) ايه تاثيرات معاكسـة او علامات عدوى على الثدييات مع اى تحت نوع من الباسيلليس المختبرة تحت الجـرعات الخاصة. التناول الفمى لجرعة $4,7 \times 10^{11}$ جراثيم/كجم وزن جسم والبللورات المرتـبطة بهـا من الباسيلليس كورستاكى فشلت فى احداث ايه تاثيرات سامة معاكسة فى الفئران. لقد اظهرت التصفية الميكروبية ان Bt تمر خلال القناه الهضمية مع تصفية كاملة بعد يومان من التجريع. لقد تم الكشف عن اعداد قليلة من Bt عرضيا فى الطحال والمعى

الاصــــغر ونقصــــت هــذة الاعداد حتى الحد الممكن الكشف عنه خلال الدراسة. اظـهرت دراســـات الســـمية الحادة عن طريق الاستنشاق عدم حدوث ايه تاثيرات معاكسة حتى مع تركـــيز ٢,٦ × ١٠ ^٧ جرثومة/كجم فى الفئران. لوحظ حدوث تصفية كاملة للباسيلليس من الرئـــتان. اظهرت دراسات الحقن الوريدي حدوث تصفية كاملة للبكتريا بعد تخطى حاجز الجلد فقد امكن الكشف عن Bt بعد يوم المعاملة من الدم والاعضاء الاخرى المختبرة. فى الـــيوم الرابع حدث خفض كبير فى اعداد البكتريا فى الرئتان والكلى والليمف والدم والمخ. قامـــت الحيوانات المعاملة بالتخلص من معظم الباسيلليس من الطحال والكبد فى اليوم ٥٧. اظهرت دراسات الحقن البريتونى لبكتريا Bt فى الفئران عدم حدوث سمية او مرضية من جـــراء حقـــن تجهيزات المواد الفعالة للباسيلليس Bt ايزاوايا ، اسرائيلينسيز وكورستاكى وتينيبريونـــيس بمعدل ١٠ ^٦ ، ١٠ ^٧ cfu/حيوان. لم تسجل وفيات بعد حقن سلالتى ايزاوايا مرة واحدة بجرعة ١٠ ^٨ cfu/حيوان. مع هذا التركيز العالى سجلت كبر قليل فى الطحال فـــى ثلاثـــة من بين الخمسة حيوانات المعاملة. لقد عوملت تحت انواع البكتريا على الجلد العـــادى وبعد حلق الشعر فى الفئران وعلى جلد الارانب ولم تظهر ايه تاثيرت معاكسة او وفـــيات ولا علـــى الزيادة فى وزن الجسم. لقد لوحظت حالات التهابات جلدية تتراوح بين القلـــيلة والمتوســـطة بعـــد التعرض عن طريق العيون فى الارانب للعديد من تحت انواع الباســـيلليس. فـــى معظم الحالات كان العرض الوحيد الذى لوحظ هو الهياج وكان عكسيا خـــلال ٧ ايـــام حيث حدث الشفاء دون ايه تاثيرات على القرنية. هذة التاثيرات تعتقد انها تتسبب عن طبيعة المستحضر وفى الغالب تكون على صورة جافة غير مائية.

٢- دراسات معملية اضافية:

لقـــد درست مرضية سلالة Bt كونكوكيان التى عزلت من نسيج ادمى منكرز بشدة مع معاملة فأر موصف مناعيا بعد العدوى عن طريق الرئتان اى بالاستنشاق. لقد وجد ان الفـــئران التى عديت عن طريق الانف بمعلق يحتوى على ١٠ ^٨ جرثومة/فأر ماتت بعد ٨ ســـاعات مع ظهور اعراض سامة سريرية. لقد اظهر التشريح Autopsy وجود مواضع ضـــرر حـــاد فى الشعب الهوائية مرتبطة بقرح وضرر فى الشريان السنخي. مزارع الدم الـــتى تحصـــل عليها بعد شق القلب انتجت مزارع نقية الباسيلليس Bt. العدوى او الحقن بالتركـــيز القلـــيل (١٠ ^٥ - ١٠ ^٧ جرثومة/فأر) احدثت او حفزت حدوث التهاب مع ثبات بكتـــيرى لمـــدة عشرة ايام على الاقل. لقد كانت معدلات الموت منخفضة عندما عوملت الفـــئران بســـلالات تجارية تحصل عليها من معامل ابوت حيث حدثت وفيات فى الفئران

الــتى عوملــت بتركــيز 10^{8} باســيلليس كورستاكي مقدارها ٨٠% بينما سببت السلالة الاســـرائيلية ٤٠% مــوت. لقد اظهر الفحص النسيجى مواضع ضرر متطابقة مع تلك مع الــتى لوحظــت مع Bt كونكوكيان. هذا يعتبر اول تقرير عن اى طرز سيرولوجى قادر علــى قــتل الفــئران عندما تستخدم بتركيز عالى عن طريق الاستنشاق الرئوى وقد كان التركــيز المســتخدم فى هذا البروتوكول اعلى كثيرا من التركيز المستخدم فى الحقل. لقد خلص الباحثون ان الوفاه ترجع الى التوكسين الدموى الذى يماثل B. cerens كما وصف بواســطة Honda واخــرون ١٩٩١. تركيز 10^{7} بكتريا/فأر لم ينتج توكسين كافى لقتل الفأر مما يوضح مستوى عالى من الهيموليسين مطلوب لاحداث القتل.

حقن الفئران تحت الجلد ببكتريا كورستاكى لم يؤدى لاى نكرزه او نمو بكتيرى فى الاعضـــاء (بيتســوب واخرون ١٩٩١). لقد ثبت عدم حدوث تاثير من السلالات Bt التى تنــتج التوكســيات المعويـــة. لقد اقترح Bishop واخرون ١٩٩٩ ان القوارض قد تكون ممــثلة لنموذج جيد للكشف عن التاثيرات المؤثرة لل Bt على الانسان. لا يوجد دليل على ان كمية التوكسينات المعوية الناتجة تكون كافية كى تسبب تاثيرات مرضية على الانسان. لقــد قــام Tsai واخــرون ١٩٩٧ بفحــص التخلص من وتوزيع جراثيم Bt (سلالة غير موصــفة) فى الفئران بعد معاملة فردية فى القصبة الهوائية بجراثيم 1×10^{8}. تنفذ الجراثيم فى الجسم تحت الرئتان وهى العملية الشائعة مع طريق العدوى هذا مع الجراثيم المعزولة لــيس فقط من الرئتان ولكن ايضا من الكبد والطحال والكلى والندب الليمفاوية المعوية. لقد لوحظــت التهابات فى الرئتان. لقد استمرت معيشة Bt فى الانسجة لما يزيد عن ٢١ يوم ولم يثبت حدوث انبات للجراثيم. اظهرت العديد من الدراسات فى دول مختلفة عدم حدوث تاثيرات على الثدييات الصغيرة. لقد وجد هالكوفا واخرون ١٩٩٣ عدم حدوث ايه تاثيرات مــن جــراء الــتعرض الفمــى او الجلدى او عن طريق الاستنشاق لمستحضر بالموسيد (الباســيلليس اسرائيلينســيز) الـــى الفئران. لقد قام Siegel واخرون ١٩٨٧ باختبار ستة مستحضـــرات تجاريـــة للباسيلليس الاسرائيلية للوقوف على السمية والعدوى على الفئران والجــرذان والارانـــب. التعرض الفمى (4×10^{7} بكتريا / حيوان) او عن طريق الرئتان ($2,05\times10^{6}$ بكتريا/حيوان) على الفئران لم تسبب ايه وفيات. لقد ادى الحقن البريتونى لواحــد مــن المستحضـــرات علـــى الفأر الى حدوث موت بينما لم يحدث نفس التاثير مع المستحضـــرات الاخـــرى. لقد احدثت السلالة الاسرائيلية مع التركيزات العالية فقط (10^{8} cfu/فأر) موت بنسبة عالية.

٣- دراسات حقلية على الثدييات الصغيرة:

القليل من البحاث قاموا باستكشاف تاثير معاملات Bt على الثدييات الصغيرة تحت الظـــروف الطبيعية. كجزء من الاستكشاف العريض لتاثير العديد من المبيدات فى مكافحة دودة الـــبراعم على الصنوبره فى اونتاريو قام Innes and Bendell ١٩٨٩ باستكشاف مجمـــوع القوارض والزبابة فى قطع تجريبية معاملة (٢٠ بليون وحدات دولية/هكتار من الثوروســـيد ٤٨ إل يـــو) وغـــير المعاملة. لقد تم اصطياد اربعة انواع من الزبابة وثمانية انواع من القوارض من خلال مصائد بعد المعاملة بالمبيدات الحشرية. لقد ظهر ان Bt لها تاثـــير واضـــح علـــى وفـــرة الثدييات الصغيرة وقد دعمت هذة النتيجة عمل Buckner واخـــرون (١٩٧٣) الذيـــن وجـــدوا عدم تاثير للباسيلليس على خمسة انواع من الثدييات الصغيرة فى مانيتربا. غذاء الزبابة يشمل اعداد كبيرة من يرقات الحشرات. خلال فترة ما قـــبل المعاملة كانت الوفرة وتركيب المجموع S.cinererrs مشابهة فى المقارنة والمناطق التجريبـــية. بالـــرغم من ان الوفرة الكلية للزبابة كان متشابها بعد الرش وكانت هناك عدد قلـــيل من ذكور الزبابة البالغة مع عدد اكبر من الشباب فى المناطق المعاملة مقارنة بغير المعاملـــة. لقد اتضح ان هجرة الذكور البالغة زادت بشكل واضح بعد الرش. بعد الرش ثم اكل يرقات حرشفية اجنحة اكثر فى القطع غير المعاملة. اليرقات الصغيرة والاناث البالغة ولـــيس الذكـــور البالغة للزباب غيرت غذائها من يرقات الحشرات الى ضحايا اخرين فى المنطقة المعاملة. الثدييات مثل الخفافيش وغيرها والتى تتغذى على الحشرات الحساسة قد تتاثر بشكل غير مباشر من جراء خفض وفرة الغذاء بسبب رش البكتريا Bt.

تاثير الباسيلليس على الثدييات الكبيرة:

لقد تم عزل Bt من حالة قاتلة فى الابقار المصابة بالتهاب الثدى(Gordon ١٩٧٧) ومـــع ذلك لم يجرى سوى القليل من الدراسات على الثدييات الكبيرة. لقد اجرى Hadley واخـــرون ١٩٨٧ دراسة سمية حادة لمدة ٥ شهور للمبيد الحشرى Bt فى الاغنام. لقد تم وضـــع منـــتجات Bt الديبـــيل والثوروســـيد مـــع الغـــذاء لمـــدة ٥ شهور بجرعة ١٠^{٥} مللجـــم/كجـــم/يـــوم (حوالى ١٠^{١٢} جرثومة/يوم). لم يظهر اى تاثير مرتبط بالمعاملة على تطـــور وزن الجســـم او المعايـــير الكيميائـــية للتاثيرات السريرية كما لم تلاحظ مثل هذة التغـــيرات الشاملة. لقد وجد ان عينات الدم والانسجة التى اخذت قبل وقت قتل الحيوانات موجبة للباسيلليس.

تاثير الباسيلليس على الانسان:

لقــد زاد الاهــتمام فى السنوات الاخيرة عن المرضية التى يحدثها الجنس باسيلليس علــى الثديــيات ولــو جزئيا بسبب ان الانواع العديدة الاخرى داخل الجنس تسبب عدوى متفاوتة فى الانسان. لقد عرف منذ زمن طويل ان الباسيلليس انثراكس ممرض عنيف على الثديــيات وكــان يعتقد ان B. cerreus غير ضارة بالنسبة لباسيلليس الانثراكس ولو انها ثبــت احداثهــا للتســمم الغذائى المتوسط كما سجلت علاقتها بحالات عدوى العيون بشكل خطــير قــد يصــل الى حد العمى. لقد تم عزل البكتريا من الجروح المحترقة وكذلك من اماكــن عض الحشرات ومرضى الالتهاب السحائى meningitis (Damgaard واخرون ١٩٩٧-ب). حديــثا تكونت قناعة لدى رجال البكتريولوجى وجود افراد غير ممرضة من جنس الباسيلليس قادرة على احداث امراض على الانسان ايضا. بالرغم من ان الباسيلليس Bt مستخدمة منذ ما يزيد عن ٦٠ عاما فى مكافحة الافات الحشرية الا انه لا يوجد سوى القلــيل جدا من التقارير التى تشير الى حدوث عدوى سريرية تتسبب عن هذا الكائن يعتقد الكثــير فــى ان هــذا الوضع يرجع الى التقدير الاقل من الحقيقة بسبب قصر الامكانيات الخاصــة بالتشخيص فى المعامل والفشل فى تعريف عزلات الباسيلليس للانواع الصحيحة وطبــيعة الخلــط الميكروبــيولوجى لــبعض العينات السريرية ورفض العزلات المحدثة لتاثــيرات سريرية واعتبارها ملوثات. مثال ذلك ما اشار اليه جاكون واخرون ١٩٩٥ من ان عــزلات Bt التى تسترجع من المرضى بالجروح عرفت بشكل غير صحيح على انها B.cereus. مازلنا فى حاجة لطرق ونظم تمكن من التعريف الصحيح لعزلات Bt وتمكن من التفرقة بينها.

تجارب التعرض المباشر للادميين تعتبر الان عمل غير اخلاقى ولكنها كانت تجرى فى الماضى. المتطوعين من البشر الذى تعرضوا للباسيلليس عن طريق التناول الفمى (٣ × $١٠^{٩}$-١٠ جــرثومة/يــوم لمــدة ٣-٥ ايام) او عن طريق الاستنشاق (١٠٠ مللجرام ثوروســيد لمدة ٥ ايام) لم يظهر عليهم ايه اعراض مرضية (فيشر وروزنر ١٩٥٩). لقد سجل نفس الباحثان ١٩٥٩ وضع صحى طبيعى فى ثمانية من العمال فى مصنع انتاج Bt . لقد تعرض هؤلاء لمدة ٧ شهور متواصلة لعمليات التخمر وعمل الكعلة البكتيرية الرطبة وكذلــك تجهــيز المستحضــر النهائي. على العكس من ذلك فان ثلاثة من مجموع اربعة متطوعيــن الذين تناولوا طعام ملوث صناعيا بالسلالة الروسية للباسيلليس جاليريا ($١٠^{٥}$ - $١٠^{٩}$ خلــية/جرام) ظهرت عليهم علامات تسمم غذائى بعد فترة تحضين ٨ ساعات (Ray ١٩٩١).

العدوى infections:

لقد حدثت حادثتان عن الصحة المهنية خلال تداول السوائل عالية التركيز فى الباسيلليس Bt. لقد سجل Sample and Buettner ١٩٨٣) الى ان القرحة القرنية ترجع الى Bt بعد التعرض العرضي لعطسة من المستحضر التجارى (ديبيل ، باسيلليس كورستاكى) فى العيون التى كانت قبلا فى الفلاحين الاصحاء بعمر ١٨ سنة. العلاج بالخبناميسيين تعالج القرحة. لقد اقترح سيجيل وشارولا (١٩٩٠). امكانية انه بينما الجراثيم قد يكون ثابتة فى العيون وتسترجع فانها قد لا تسبب القرحة. لم يؤخذ فى الاعتبار وضع الخلايا الخضرية حيث انها لم توجد فى القرحة. لذلك اقترح البحاث انه من المفيد اتخاذ الاحتياطيات للوقاية من هذة العدوى عند استخدام المبيدات الحشرية الحيوية والتي سبق اعتبارها غير ضارة على الانسان. الحادثة الثانية وقعت فى انجلترا عندما جرح طالب بحث يدة بابرة تحتوى على معلق الجراثيم وبلورات الاندوتوكسين للباسيلليس اسرائيلينسيز (6×10^8 / ملليلتر) مع بكتريا خضرية ملوثة A. calcoaceticus Var. anitratus والذى نادرا ما يسبب عدوى طرية فى النسيج (Warren واخرون ١٩٨٤). خلال ساعتان فقط ظهرت الام فى الاصابع ثم حدث انتفاخ وفقد اللون. لقد حدث شفاء للمصاب بعد ٥ ايام من المعاملة بالمضادات الحيوية. لقد اجريت دراسات لاحقة على العزلات التى استرجعت من الجرح. لقد اتضح وجود مستويات متوسطة من نشاط التوكسين الخارجى بينما السلالة Acitnetobacter منفردة او مخلوطة فى المزرعة مع Bt احدثت تفاعل قوى مع النكرزة فى نظام تحليل الاكسوتوكسين. لقد اظهر راشح المزرعة المختلطة تاثير قاتل بينما لم يثبت الراشح من اى سلالة اى تاثير قاتل عندما حقن فى الوريد. لقد وجد الباحث ان التوكسين الاولى البللورى للباسيلليس اسرائيلينسيز يمكن ان ينشط خارج الكائن الحى بواسطة انزيمات البروتينريس فى مزارع Bt القديمة او فى رواشح المزرعة من البكتريا الغريبة.

لقد قام Damgaard واخرون (١٩٩٧–ب) بعزل Bt من الاصابة او العدوى فى الجروح المحترقة وكذلك من الماء التى استخدمت فى علاج هذة الجروح. المصابين الذين يعانون من حروق ٣٠–٧٠% فى اجسامهم والذين يعتبرون قليلى المناعة بشكل كبير. مصدر تلوث امدادات المياه غير معروفة ولكن كان من الواضح ان عزلات Bt الملوثة لم تنشأ من مخلفات المبيدات الحيوية. الحجم الجزيئى الملاحظ للتوكسينات الاولية التى تتضمن الدلتا–اندوتوكسينات كان يختلف عن ذلك الذى استخدم فى التجهيزات التجارية ولم يظهر ايه فاعلية او نشاط ضد يرقات ابى دقيق او يرقات البعوض ايدس ايجيبتى.

بالاضافة الى ان السلالات Bt لم تكن سوطية بينما كل السلالات التى استخدمت فى تجهيز المبيدات الحيوية كانت سوطية. حديثا قدم الباحث Hernandes واخرون ١٩٩٨ حالة جندى مصاب بجروح معدية بالطرز السيرولوجى Bt konkukian H 34 وهو طراز منشأه كوريا. حيث انه لم يكن من الواضح ما اذا كان Bt هو مسبب العدوى او هو ملوث بسيط فان المقدرة المرضية لهذة السلالة على الثدييات تم فحصها فى نموذج اختبار الجلد فى الفئران ناقصة المناعة مقارنة بمجموعة حيوانات عادية المناعة. لقد حدثت مواضع التهابات فى كل الحيوانات عندما استخدم ١٠^٧ من حقن cfu. لقد تم استرجاع Bt من عينات الفئران ناقصة المناعة فقط. لقد اظهرت التجارب على النماذج الحيوانية مقدرة Bt كونكوكيان على احداث العدوى ونكرزة فى العضلات myonecrosis فى غياب المناعة. لقد خلص الباحثون الى ظهور اعراض سريرية فى حالة حدوث تهتك فى الانسجة.

الامراض المعدية:

لقد اتفق على ان B. cereus ملوثة للغذاء وتشترك فى بعض حالات تسمم الغذاء كل سنة (جونسون ١٩٨٤). يحدث المرض فى صورتان مميزتان من الاعراض هما القئ المحفز بالتوكسين Toxin-induced emetic والاسهال المتسبب عن التوكسين المعوى للباسيلليس. لهذا السبب فان وجود وكمية الباسيلليس سيريرس تستكشف بشكل روتينى فى بعض الاغذية. لقد اقترح اندرسون واخرون (١٩٩٨) ان الجوعة الفعالة تكون منخفضة لاقل من ٥ × ١٠^٤ جرثومة (٢٠٠ جرثومة/جم غذاء). الطرق المستخدمة حاليا لاستكشاف B. cereus فى الغذاء والعينات السريرية لاتسمح بالتمييز بين B. cereus, Bt . توضع العينات فى اطباق على بيئة متخصصة للباسيلليس سيريوس وعندئذ تنتشر المستعمرات على اجار الدم. سلالات B. cereus تعرف بحوافها غير المنتظمة وبانتاج انزيم Leci thinase وعدم المقدرة على تخمير المانيتول على بيئة متخصصة. هذة الطريقة لا يمكنها التفرقة بين Bt والسيريوس على الاطلاق. لقد نجح جاكسون واخرون ١٩٩٥ فى عزل سلالات Bt من اربعة مصابون فى المستشفيات والذين يعانون من الالتهابات المعدية. لقد كان هؤلاء البحاث هم الوحيدون الذين ربطوا بين الالتهابات المعدية والباسيلليس Bt وبعدها تضاربت الاقوال وقيل ان Bt قد تشترك فى حالات اكثر ولكنها لا تكتشف بسبب قصور الطريقة الخاصة بامكانية التمييز بينها وبين الباسيلليس سيريوس. حديثا امكن الكشف عن التوكسين المعدى فى السلالات الستة من Bt التى

تستخدم في مكافحة الحشرات والتي تعتمد على الباسيلليس كورستاكي (HD_1 وثلاثة اخرون) و Bt اسرائيلينسيز و Bt تينيبريونسيس. هذا بينما اختبار الجرعة العالية فى الفئران على امتداد ثلاثة اسابيع لم تظهر ايه تاثيرات ظاهرة. هذا ادى الى الاقتراح بان الفئران قد لا تكون حيوان الاختبار المناسب والحساس لدراسة التسمم الغذائي.

العديد من الدراسات الحديثة اشارت الى عزل سلالات Bt المنتجة للتوكسين المعوى من الغذاء. لقد تمكن الباحث Damgaard واخرون بعزل سلالات Bt من مختلف الاطعمة (الباستا واللبن وخبز البتسا) وكانت السلالات تنتمى للطرز السيرولوجي H للكورستاكي او neoleonensis. لقد ثبت ان كل السلالات تقريبا تعبر عن تاثيرات خلوية في خلايا Vero مما يعطى دليل عن نشاط توكسين معوى. لقد اتضح كذلك ان سلالات Bt المستخدمة في مكافحة الحشرات على المستوى التجارى , HD-567 , NB-125 HB1 لها تاثيرات خلوية سامة Cytotoxic على خلايا فيرو. من المستحيل تحديد اصل السلالات من اى من انواع الغذاء وهل هى Bt تحدث طبيعيا او من بقايا المبيدات الحيوية في السلع الغذائية الخام. الطراز السيرولوجي لبعض السلالات المعزولة كانت كورستاكي وهي الاكثر شيوعا واستخداما فى مكافحة افات حرشفية الاجنحة. لقد تم عزل Bt من العديد من الاطعمة كما سبق القول مثل البسطا ، التوابل ، الحبوب والبقوليات ونفس الحال مع البكتريا .B المعوية B. cereus. لقد عزلت سلالة Bt كورستاكي من العنب الذى يستهلك ادميا وقد اقترح ان المصدر هو مخلفات المبيدات الحيوية. لقد اشار Burges ١٩٧٦ – أ) الى عسل جراثيم Bt من الاساس الشمعى ونقلها الى العسل. لقد استمرت الجراثيم فى الحياه لفترات طويلة ولكنها لم تكن قادرة على التضاعف فى العسل النظيف. لقد تاكد ان وجود Bt فى العسل يسبب تسمم غذائي. لقد تم تحديد مستوى ١% وزن/وزن فى اساس الشمع فى Bt كحد امن فى شمع الاساس فى انجلترا (Burges ١٩٧٦ – ج). لقد اقترح ان مستحضرات مكافحة الحشرات التى تحتوى على جراثيم حيه يمكن ان تثبت وتنتج توكسينات معوية قد تمثل خطر على صحة الانسان فى حالة تلوث الغذاء مما يحتم ضرورة اتخاذ الاحتياطات عند تقويم اماكن Bt كمستحضر حيوى يستخدم في مكافحة الافات على الزراعات التى تستهلك بواسطة الانسان. حتى الان لا يوجد ما يشير الى وجود دليل قوى يربط بين الاستخدام الفعلى لمبيدات الباسيلليس وحوادث الاسهال المعوى بعد تناول الطعام (EPA مارس ١٩٩٨). قد توجد البكتريا B. cereus فى العديد من

الاغذيـــة ولكـــنها يجـــب ان تتضـــاعف وتتكاثر فيها حتى تنتج التوكسينات المسئولة عن الاعراض.

حوادث فرط الحساسية Hypersensitivity incidents:

بالـــرغم من الاستخدام الواسع للمستحضرات الحيوية المحتوية على الباسيلليس Bt ســـجلت حالتان فقط من الحساسية من خلال إصدارات وكالة حماية البيئة الامريكية EPA (Mc.Clintock واخـــرون ١٩٩٥). فى حالة تاكد ان الشخص المعرض كان يعانى من مـــرض سابق مرتبط بالحساسية. الحالة الثانية كانت لشخص معروف عنه معاناته المزمنة طـــوال حـــياتة من حساسية للغذاء. بعد التعرض لمستحضر Bt حدث صعوبة فى التنفس واحـــتقان فـــى الانـــف. المستحضـــر الـــذى تعـــرض له هذا الانسان كان يحتوى على كربوهـــيدرات خاصـــة ومواد حافظة خاصة معروف عنها احداثها للحساسية. البداية على هـــذة الحالـــة اشـــارت وخلصت الى الاستنتاج بان Bt لم تكن هى المسبب المسئول عن الحساسية.

تعرض المجتمع Community exposure:

لقـــد اســـتخدمت باسيلليس Bt لسنوات طويلة فى مكافحة الافات الزراعية والغابات دون ايـــه مشاكل. معظم الباحثين في مجال امان الباسيلليس لم يجدوا سببا لعدم الاستمرار فـــى استخدام Bt على اساس الخطر على صحة الانسان (WHO وبيكر ١٩٩٢). لقد قام Green واخـــرون ١٩٩٠ باستكشـــاف المزارع البكتيرية التى تجمع روتينيا للاغراض الســـريرية مـــن الناس الذين يعيشون فى منطقة رش الباسيلليس كورستاكى المستخدم فى مكافحـــة الفراشـــة الغجرية فى ولاية اوريجون بامريكا. على امتداد سنتان تم تعريف ٥٥ مـــزرعة ايجابية للباسيلليس Bt (حوالى ١٢٠٠٠ شخص فى المنطقة المرشوشة) وفى ٩٥ % مـــنها رؤى انهـــا ملوثات وليست هى المسئولة عن الامراض السريرية. فى الاضرار الـــثلاثة الباقية لم يثبت ان Bt سبب مرض ولم يثبت له اى دور فى حدوث المرضية حيث كـــان هؤلاء المرضى الثلاثة يعانون من مشاكل طبية. لقد اقترح الباحثون ان Bt قد يكون لهـــا بعـــض الاخطار فى الافراد قليلة المناعة ومن ثم يجب على الوكالات المسئولة عن التشـــريعات الخاصة باستخدام وتداول الكائنات الدقيقة فى مكافحة الافات ان تاخذ ذلك فى الاعتبار. مع ذلك يجب توعية الاشخاص قليلى المناعة بكيفية التعامل واستخدام مستحضر

Bt وسبل حماية انفسهم من هذة المستحضرات الامنة.لقد سجلت حالتان فى مواطنان امريكيان فى نيوبرونسويك بسبب الرش المكثف الزائد بالمبيدات الحيوية التى تعتمد على الباسيلليس Bt مما القى ظلالا عن التاثيرات الضارة التى قد تحدث بعد التعرض بما فيها حساسية الجلد والهرش وزيادة حدوث العدوى التنفسية. لذلك يجب ان يتضمن برنامج الاستكشاف الخاص بالتاثيرات الصحية فى منطقة الرش الاستمرار لمعرفة ما قد يحدث بعد الرش ولفترات ممتدة. لقد انتهى الباحثون بندرة حدوث ايه اضرار او اخطار فى الادميين بسبب التعرض لمستحضرات Bt.

لقد تم تقديم بيانات عن امان الرش الجوى للباسيلليس كورستاكى فى نيوزيلندا خلال برنامج مكافحة فراشة تاوك (Drobniewski ١٩٩٤) والذى اطلق علية عملية الخضرة الدائمة Operation Evergreen لقد وجدت السلطات الاقليمية المسئولة عن الصحة عدم حدوث حالات اجهاض او ولادة اطفال قبل اكتمال النمو بسبب رش Bt كما لم تسجل حالات حساسة كما لم يزيد عدد المترددين على الماكز الصحية المحلية بسبب الرش كذلك لم تزداد حالات الحصبة او الالتهاب الحسائى الدماغى. لقد استمر برنامج الاستكشاف الصحى حتى عام ١٩٩٩ فى مناطق تطبيق برنامج الرش ضد فراشة تاسوك.

السمية الخلوية للتوكسين المذاب:

لقد امكن استنتاج ان الدلتا-اندوتوكسين ليست سامة على الثدييات عندما تعامل فرديا وكذلك فى حالات ما تكون المعدة غير قلوية او يكون التوكسين غير نشيط بعد التناول. الدلتا-اندوتوكسين قد يذاب (ينشط) تحت الظروف القلوية (PH اكبر من ١٢) او بواسطة خليط من الظروف القلوية (PH ٩-١٠) وظروف اختزال (Huber واخرون ١٩٨١). مع الباسيلليس ثورينجنسيز اوضح ثوماس وايلر (١٩٨٣) انه بينما بلورات الدلتا-اندوتوكسين لم تظهر سمية معتبرة فى نظام الاختبار داخل وخارج جسم الحيوان فان الدلتا-اندوتوكسين المذاب فى وسط قلوى كانت سامة خلويا Cytotoxinc لخمسة خطوط مزارع خلوية للثدييات (الخلايا الليمفاوية الاولية للخنافس ، الخلايا فى الجرذان ، الخلايا السرطانية الطلائية فى الفار). بلورات البروتين الذائبة سبب تحلل دموى فى كرات الدم الحمراء الجرذان والفاران والاغنام والاحصن والادميين. الحقن الوريدى لبولورات التوكسين المذابة فى الجرذان بجرعة ١٥-٣٠ مللجم بروتين/جرام وزن جسم ادى الى حدوث شلل سريع تبعة الموت خلال ١٢ ساعة. الحقن تحت الجلود سبب وفاة الفئران لرضيعة خلال ٢-٣ ساعات. لقد قام Cheung واخرون ١٩٨٥ بفحص تاثيرات الدلتا-

اندوتوكسين المذاب فى القلوى من الباسيللس اسرائيلينسيز عندما حقن فى الجرذان. لقد سجلت سمية عالية فى داخل الجسم invivo بمعدل ١-٥ جزء فى المليون (مللجم توكسين / جم وزن جسم طازج). الاعراض التى ظهرت على الجرذان تماثل ما تحدثة التوكسينات العصبية العضلية وهى تشمل فقد اليقظة والتنفس غير الهادئ كما تفقد بعض الحيوانات نشاط الارجل الخلفية. نتائج الاختبارات على كرات الدم الحمراء الادمية خارج الجسم اشارت ان البكتريا الاسرائيلية المنتجة للبرتينات البللورية الابادية على الحشرات امنة على الانسان عند ملامسة البوتينات ولكنها غير امنة عند ذوبانها (رانى وبالارمان ١٩٩٦).

الباب الثالث

العوامل البيئية وعلاقتها بثبات وسمية ونقل وانتشار بكتيريا الباسيلليس فى المستحضرات الحيوية لمكافحة الآفات

مقدمـــة: بعـــد أن انتهيـــت من الباب الثانى جال فى خاطري أن أشير إلى بعض النواحي الخاصة بالميكروبيولوجيا التطبيقية وهو عنوان الكتاب من تأليف ومراجعة أساتذتي العظام أ.د. عـــبد الوهـــاب عبد الحافظ . أ.د. محمد الصاوى محمد مبارك، أ.د. سعد على زكى محمـــود رحمـــة الله والصادر عن المكتبة الأكاديمية، ١٩٩٦ ولكنى آثرت الاستمرار في الاســـتطراد المنطقـــي وهو دور العوامل البيئية على ثبات مستحضرات بكتريا الباسيلليس وفعاليـــتها علـــى الحشرات ونقل وانتشار الكائن الحيوي الممرض البكتيري وكذلك علاقة البيـــئة بـــأداء مخـــالط البكـــتريا مع المبيدات الأخرى. النواحي الخاصة بالميكروبيولوجيا التطبيقية سوف أشير إليها باختصار شديد فى هذه المقدمة خاصة أننى تناولت فى الأبواب الســـابقة بعـــض الاصطلاحات العلمية عن ماهية بكتريا الباسيلليس والطرز السيرولوجية والعـــدوى والسمية دون توضيح كافي. لذلك كان من حقي والقارئ الكريم أن نتلقى معاني هـــذه المصـــطلحات حـــتى يكـــون اقتراب إدخال المستحضرات الحيوية بقيادة المايسترو الباســـيلليس القديم الحديث المنفرد الأجناس والأنواع والسلالات ذات الأمان النسبي العالي دون إنكـــار لاحتمالات بعض التأثيرات الضارة فى البيئة وعلى مكوناتها بما فيها الإنسان قاهـــر الطبـــيعة والمقهور بمثل هذه الكائنات الدقيقة الضعيفة التى تقف شامخة تتحدى كل الصعاب والظروف البيئية المعاكسة شاهدة على قدرة الخالق العظيم الذي خلق كل شئ فى أحســـن صورة وتقويم واتزان مذهل يجب على الإنسان الظالم لنفسه أن يتدبر كل شئ فيه وحوله خاصة الكائنات الدقيقة.

لقـــد ســـبق التنويه بماهية ومكونات النظام البيئي Ecosystem الشامل من أرض ومـــاء وهـــواء وأحياء دقيقة كانت أم راقية بالإضافة إلي الجماد... لست فى حاجة للقول بـــأن لكل من هذه المكونات دورا يقوم به سخره الله سبحانه وتعالي للقيام به خدمة للأنسان ساكن كوكب الأرض وحامل الأمانة التى أبت الجن والملائكة على حملها خوفا من عظمة الأمانة والمسئولية وتجنبا للعبث وهوى النفس ومن ثم حملها الإنسان فظلم نفسه ظلما كبيرا بيـــنا حيث أخذ يعبث بها مما أخل بالتوازن بين الخلائق وما أستتبع ذلك من مشاكل لا قبل لـــنا بهـــا خاصـــة ما يتعلق بالتلوث البيئي بالكيميائيات الصناعية وحتى الطبيعية منها. ما يعنينـــي في هذا المقام المجال الحيوي "البايوسفير Biosphere" أي نظام الأحياء وكل ما

يوجـد على سطح كوكب الأرض يندرج تحت هذا المجال حيث مجتمع الأحياء بالإضافة إلي المكونات غير الحية طبيعية كانت أو كيميائية ... قد يتساءل البعض عن سر وأسباب تـنوع الكائـنات الحية دقيقة كانت أم راقية والإجابة في غاية البساطة وهى أنه حركية أو ديناميكـية النظام البيئي هي السبب. الغوص فى بحار الكائنات الدقيقة يوضح سيادتها فى النظام البيئي وتداخلها مع الكائنات الأخرى تتأثر بها وتؤثر عليها مما أدى إلى ظهور علم جديـد أطلـق عليه "علم البيئة الميكروبي" "Microbial Ecology" والذي يهتم بدراسة الكائنات الدقيقة فى الأوساط الطبيعية التى توجد فيها ودراسة العلاقات المتبادلة بينها وبين الأوساط البيئية من هواء وماء وتربة وغذاء وأمراض وغيرها. أليست هذه الدراسات هي التـي قادت للكشف عن مجتمع الباسيلليس بأنواعها وأصنافها وأجناسها ومعرفة دورها فى مكافحـة الآفات الحشرية وتأثيراتها الجانبية الضارة على المكونات البيئية أن وجدت وما تحدثه على الإنسان وهل ترقى إلي أن نطلق عليها مبيد حيوي biopesticide أم لا وهل هي اقتراب جديد أم كانت معروفة منذ سنوات عديدة ... هذا ما سأحاول الإجابة عليه.

توجـد الكائـنات الدقيقة في الأوساط الطبيعية بأعداد وأنواع متفاوتة ومن النادر أن تـتواجد فى صورة مزارع نقية حيث عينة التربة مثلا تكون محتوية على بكتريا وخمائر وفيروسـات وفطريات وطحالب وبروتوزوا وغيرها في توازن ووئام. ها هي الباسيلليس توجـد في التربة بأجناس وأنواع وأصناف وطرز سيرولوجية كي تكافح من ....؟ تكافح الحشـرات مـن الرتـب المختلفة خاصة حرشفية الأجنحة. تعيش هذه الكائنات الخليط مع بعضـها بالوسط وتتداخل فى النشاط بصور مختلفة تتراوح ما بين النشاط أو التضاد. من أكـبر المشاكل التى تعترض العاملين في مجال الكائنات الدقيقة العزل والتنقية والتعريف. لكل كائن دقيق على غرار الكائنات الراقية ظروف مثلى ينمو ويتكاثر ويؤثر ويتأثر داخلها وحولها. بالطبع تتغير الظروف باستمرار مما يؤثر على تواجد واستمرارية الكائنات الحية بمـا فيها الدقيقة وقد يؤدى التغير إلى اختفاء كائن ما أو زيادة أعداد ونشاط كائن آخر أو حـدوث طفـرة فـى الكائن بحيث تصبح الطفرة قادرة على العيش في الظروف الجديدة والأقرب للواقع أن الكائن الحي يتأقلم مع الظروف الجديدة. السؤال الذي جال في خاطرى الآن دون سـبب ظاهـر يتمثل في التوكسينات التي تنتجها الكائنات الدقيقة مثل الباسيلليس سـواء كانت توكسينات خارجية أو داخلية ... هل تنتج فى الكائن المستهدف وهو الآفة أو تنـتج فـى المزارع النقية لها ؟ هذا ما سوف أجيب عنه فى موضع لاحق ولو أنه واضح التحديد والمعالم فى الأبواب السابقة.

لقـد تطور علم الميكروبيولوجيا التطبيقية بشكل مذهل فى السنوات الأخيرة وأصبح الاســم الشائع المتداول "الميكروبيولوجيا الصناعية " والتي تعنى استخدام الميكروبات تحت ظــروف ممكنة لكي تنتج مواد نافعة بمستوى تجارى مثل إنتاج الكيميائيات النقية (أسيتون – بـيوتانول) والمضــادات الحيوية (بأنواعها المختلفة) وما تلي ذلك من تعاظم الصناعات التخمــيرية فى إنتاج الكيميائيات والمواد الحيوية بما فيها المبيدات الحيوية موضوعنا الآن. لقـد أصــبح معــروفا دون أي شك أن الميكروب ما هو الإ مصنع لأنتاج الكيميائيات من خلال سلالات منتخبة أو مهندسة وراثيا من الطحالب أو الفطريات أو الخمائر أو البكتريا. مــن أهــم الأســرار الصناعية فى هذا المجال " نوع وطبيعة وخصائص ومصدر السلالة المنــتجة للمــواد الحــيوية الــنافعة". من المنتجات الميكروبية المواد والإضافات الغذائية (بروتيــن، أحماض عضوية وأمينية)، الكحوليات والمشروبات الكحولية (اثيانول – بيرة)، كيميائــيات صــناعية (أحمــاض – مذيــبات عضــوية – أنزيمات) كيميائيات صيدلانية (مضــادات حــيوية، مركــبات اســتيرويدز، أنسولين ...)، مواد بيولوجية (فاكسينات – مضــادات السيرم)، أغراض التحليل والتقديرات الحيوية... الجدول (٣-١) يوضح بعض المنتجات الحيوية الهامة التى تنتج بواسطة البكتريا.

مــن المعــروف وجــود علاقات متبادلة بين العائل والميكروب الممرض موصفة ومعــروفة بل هي أساس تحديد الأسلوب الأمثل للعلاج. تحدث الأمراض داخل الجسم من خــلال التأثــير على عمليات التمثيل أو إضعاف جهاز المناعة أو أحداث خلل فى العوامل الوراثــية خاصة الشذوذ التركيبي في الكروموسومات ... الخ. لقد سبق القول بأن مسببات الأمــراض الخطــيرة مثل السرطان موجودة كامنة داخل الجسم فى سلام وقد أطلق عليها المســببات الأولية للسرطان Procarcinogense وهذه يحدث لها تحفيز من جراء بعض العوامــل الخارجــية مثل التدخين والانتقال والمبيدات ... الخ والعوامل الداخلية. فى هذا المقــام نحن معنيون ليس بالبكتريا نفسها ولكن بالتوكسينات الخارجية والداخلية وهى على جمــيع المفاهيم والأعراف مواد كيميائية مما دعي الكثير من الباحثين والعلماء الاستفسار عــن أمان هذه المبيدات الحيوية التى تتألف من البكتريا بسبب هذه السموم أو التوكسينات. يحدث المرض وتظهر الأعراض نتيجة للعلاقات المتبادلة بين الميكروب الممرض والعائل القــابل للإصابة فقد أستقر فى الأعراف أن المرض الناتج من العدوى بالميكروب لا يتحدد مــن جــراء نواحي الميكروب الممرض فقط ولكن بعلاقات مع العائل ومقدرة العائل على مقاومته، فقد تحدث العدوى ولا تظهر أعراض المرض.

فــي حالـــة البكـــتريا باسيلليس فأنها لكي تعمل كمبيد حيوي قاتل ليرقات حرشفية الأجنحة أو غيرها يجب أن تدخل الجسم كما سبق القول وهذه هي العدوى بالمعنى الدارج وبعــد ذلــك تفـــرز المواد السامة (التوكسينات) حتى تضر بالعائل من خلال التأثير على تركيــب الخلية أو وظيفتها أو تفرز أنزيمات تسبب حساسية. تتوقف قدرة الميكروب على أحداث المرض على مقدرة السموم التي يفرزها على قتل العائل المستهدف مكافحته وقتله. قــد تفـــرز الســـموم خـــارج الخلية الميكروبية (توكسينات خارجية) أو تبقى داخل الخلية (توكسينات داخلية). السموم الخارجية مواد قابلة للانتشار من داخل الخلية التي تنتجها إلى الوسط الخارجي المحيط بالميكروب ومن ثم يمكن الحصول عليها من المزرعة النامي بها المـــيكروب. لقد ثبت أن السموم الخارجية عبارة عن مواد بروتينية وزنها الجزيئي مرتفع قــد يصـــل الى مليون والت   ومن ثم يمكن لأنزيمات تحليل البروتين هضمها وهذا هو سبب عدم أحداثها تأثيرات ضارة أو سامة على الجسم إذا أخذت عن طريق الفم مع بعض الأســتثناءات. تفقــد هــذه الســموم الخارجية سميتها خلال التخزين الطويل أو تعريضها للحرارة (٧٠°م) أو من جراء المعاملة بالشبة أو الفينولات والأحماض والفورمالدهيد وذلك بســبب تثبــيط عمل بعض الأحماض الأمينية الداخلة في التكوين البروتيني. الهدم أو فقد الســمية ينشأ من تحول التوكسين الى مادة غير سامة تسى توكسويد **toxoid** ذات صفات أنتيجنــية تحفــز الجســم علـــى إنـــتاج مضادات التوكسين **antitoxins** التي تقاوم السم الميكروبــي المــتكون بجسم العائل ومن ثم تفيد في حماية الأشخاص المعرضين للتسمم. السموم الخارجية ذات تأثير متخصص فمنها مايؤثر على الجهاز العصبي **neurotoxins** (التيــتانوس) أو الجهـــاز الهضمي **Enterotoxin** (الكوليرا) أو الخلايا ويسمى سم خلوي **cytotoxin** (الدفـــتريا) ومـــنها مـــا يســـبب احمـــرار الجســـم **Erythrogenic-toxin** (ستربتوكوكس بيوجنيز).

الســـموم الداخلــية توجــد فــي الغالب في جدار الخلية البكتيرية وهي ذات صفات أنتيجنـــية ضعيفة وتتكون من مواد معقدة كما سبق القول تحتوى على الببيدات والسكريات العديــدة والبروتيــن. تحــدث هذه التوكسينات في حالتنا هذه حالات تسمم **toxicity** وفي حـــالات أخـــرى تحدث حالة الحمى **Pyrogenicity**. لقد ذكر أن حدوث الحمى والسمية ترتــبط بالجـــزء الدهنـــي – عديـــد السكريات الداخل في تركيب السم بينما تعود الصفات الأنتيجينية إلى الجزء البروتيني في التوكسين.

الجـــدول (٣-٢) يوضح الفروق بين السموم الخارجية والداخلية بشكل عام. الجدول مـــأخوذ مـــن كتاب "الميكروبيولوجيا التطبيقية" من تأليف أساتذتى الكبار أ.د. عبد الوهاب

عبد الحافظ ، أ.د. محمد الصاوى مبارك ومراجعة أ.د. سعد على زكى والصادر من المكتبة الأكاديمية عام ١٩٩٦.

جدول (٣-١): بعض المنتجات الحيوية الهامة المنتجة بواسطة البكتريا

المنتج	الميكروب	مجالات الاستعمال
إنزيم أميليز بكتيري	B. subtilis	تحليل النشا، النسيج، الورق
إنزيم بروتييز بكتيري	B. subtilis	تسوية اللحم، الجلود، الألياف، إزالة البقع
إنزيم إستربتو كاينيز	Streptococcus equisimilis	استعمالات طبية لإذابة الجلطه
مبيدات حيوية للآفات	B. thuringiensis B. popilliae B. sphaericus	مقاومة يرقات الحشرات، خاصة حرشفية الأجنحة، مقاومة البعوض

جدول (٣-٢): بعض مميزات السموم الميكروبية الخارجية والداخلية

الصفة	سموم خارجية	سموم داخلية
الإفراز	خارج الخلية الميكروبية	داخل الخلية المكروبية
المسبب	بكتريا جرام موجب	بكتريا جرام سالب
التركيب الكيميائي	بروتين	معقد من ليبو عديد السكريات وبروتين
تأثير الحرارة	تتأثر بالحرارة وتفقد سميتها عند ٦٠-١٠٠°م لمدة ٣٠ ق	تتحمل الحرارة بما في ذلك الغليان
المناعة	يمكن تحويلها الى توكسويدات. تتعادل مع مضادات التوكسين.	لا تكون توكسويدات. التعادل صعب مع مضادات التوكسين.
التأثير البيولوجي	متخصص شديد التأثير	التأثير العام ، متعدد تكون أغلبها حميات وحساسية عامة
الجرعة القاتلة	كميات صغيرة جدا	كميات أكبر، عن تلك الخاصة بالسموم الخارجية

الشيء بالشيء يذكر حيث أن شدة عدوى بعض الميكروبات المعدية تعود جزئيا إلى ما تفرزه من إنزيمات خارج الخلايا تساعد الميكروب الممرض على الغزو والنفاذ إلى الأنسجة والانتشار بها ومقارنة أجهزة العائل الدفاعية مما يزيد من شدة العدوى. تفرز البكتريا المرضية المذيبة لكرات الدم الحمراء مادة الهيمولايسين التى تذيب كرات الدم الحمراء وينفرد منها الهيموجلوبين من المواد الأخرى التى تفرزها الميكروبات خارج الخلايا ولها علاقة بزيادة شدة العدوى الأمونيا وفوق أكسيد الأيدروجين (الميكوبلازما) وغيرها.

جدول(٣-٣):بعض الإنزيمات الخارجية،التي تفرزها الميكروبات، ولها علاقة بالعدوي

الإنزيم	أمثلة من البكتريا المنتجة	التأثير
Coagullase	Staph. Aureus	يشارك في تجليط البلازما
Collagenase	CI. perfringens	يحلل الكولاجين، وهي الياف بالعظام وبالنسيج العضلي
Hemolysin	Staph., Streph.,Clostridium	يذيب كرات الدم الحمراء
Hyluronidase	Staph. aureus, Clostridium	يحلل حامض الهياليرونيك، الرابط للأنسجة
Lecithinase	CI. perfringens	يحلل كرات الدم الحمراء، وكثير من خلايا الأنسجة
Leucocidin	Staph. aureus, Streptococcus	يقتل كرات الدم البيضاء
Streptokinase	Streptococcus	يذيب فيبرين الدم المتجلط، فيسيله فيساعد بذلك علي انتشار الميكروب

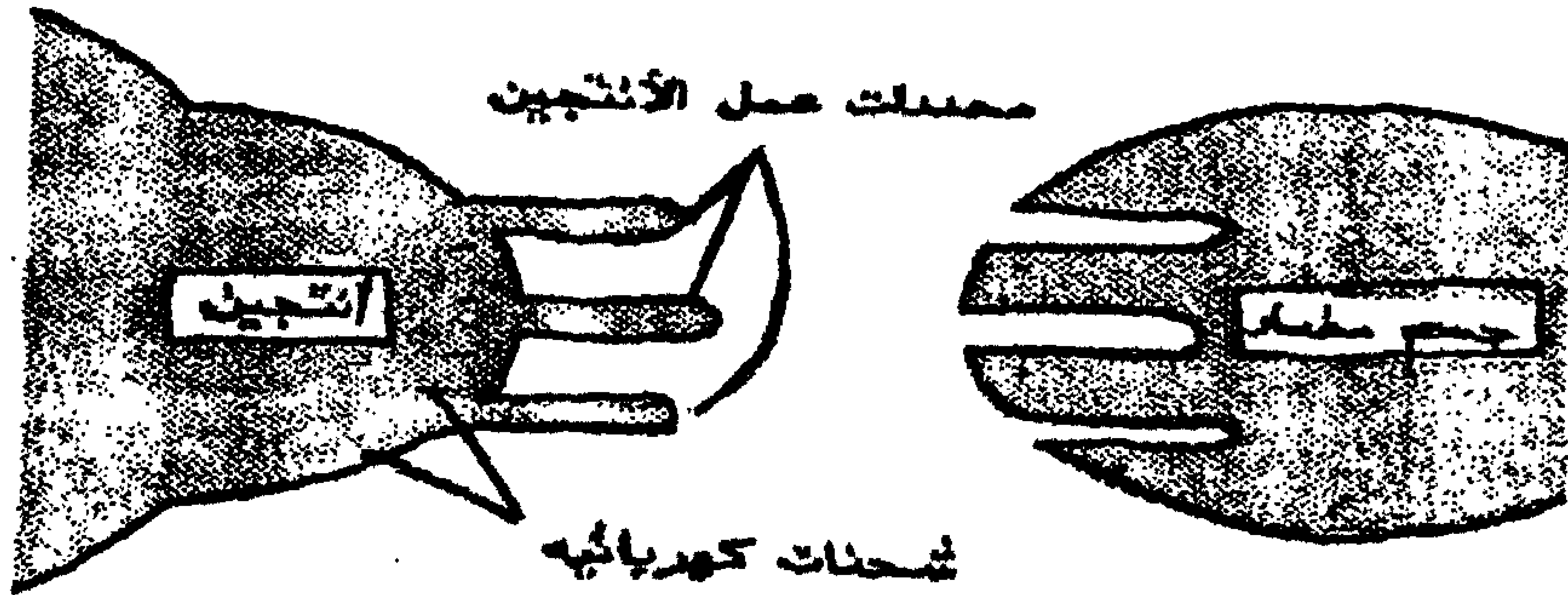
قد يحتوى النوع البكتيري على سلالات مختلفة بعضها قادر على أذابه كرات الدم الحمراء وهى تتميز بشدة عدواها بالمقارنة بالسلالات التى لا تذيب كرات الدم الحمراء.

بعض أنواع البكتريا المرضية تملك تركيبات خلوية لها علاقة بزيادة شدة العدوى مثل الكبسولات والشعيرات. إذا فقدت هذه التراكيب أو حدث من خلال الطفرية تضعف مقدرتها وشدة العدوى مثل بكتريا الالتهاب الرئوي. بعض الميكروبات لها مقدرة على إصابة موضع معين خلايا كانت أو أنسجة أو طور معين أو مستقبل معين. إذا تكلمنا عن منافذ الدخول نقول أن المصادر الأساسية لعدوى الإنسان والحيوان هي المرضى وحاملي الميكروب والتربة. منافذ الدخول متعددة تشمل الجلد والمسالك التنفسية والقناة الهضمية والمسالك البولية التناسلية ومفصليات الأرجل.

طرق الانتقال والانتشار للميكروبات المرضية متعددة وهى تشمل الهواء أو الأغذية والمياه أو باللمس المباشر أو بواسطة مفصليات الأرجل وهناك ميكروبات تنقل عن طريق الجروح والحقن والدم كما فى أمراض الالتهاب الكبدي والإيدز. وعندما ينتشر المرض المعدي بين عدد كبير من الأفراد قد يسبب حالة وباء Epidemic وهذا ما دفعني لتناول حدوث وبائيات من جراء التعرض المستمر على المدى الطويل للكيميائيات والملوثات حيث نظرت إليها من زاوية الأمراض المعدية ومسبباتها.

لقد ذكر في مواضع كثيرة الأنتيجينات Antigen ويطلق عليها المستضدات وهى أي مادة التي عند دخولها الجسم تؤدى إلى حدوث مناعة مكتسبة وذلك بتكوين أجسام مضادة تدور مع الدم أو تؤدى إلى زيادة عدد الخلايا الليمفاوية وكلاهما تتحد مع الجسم.

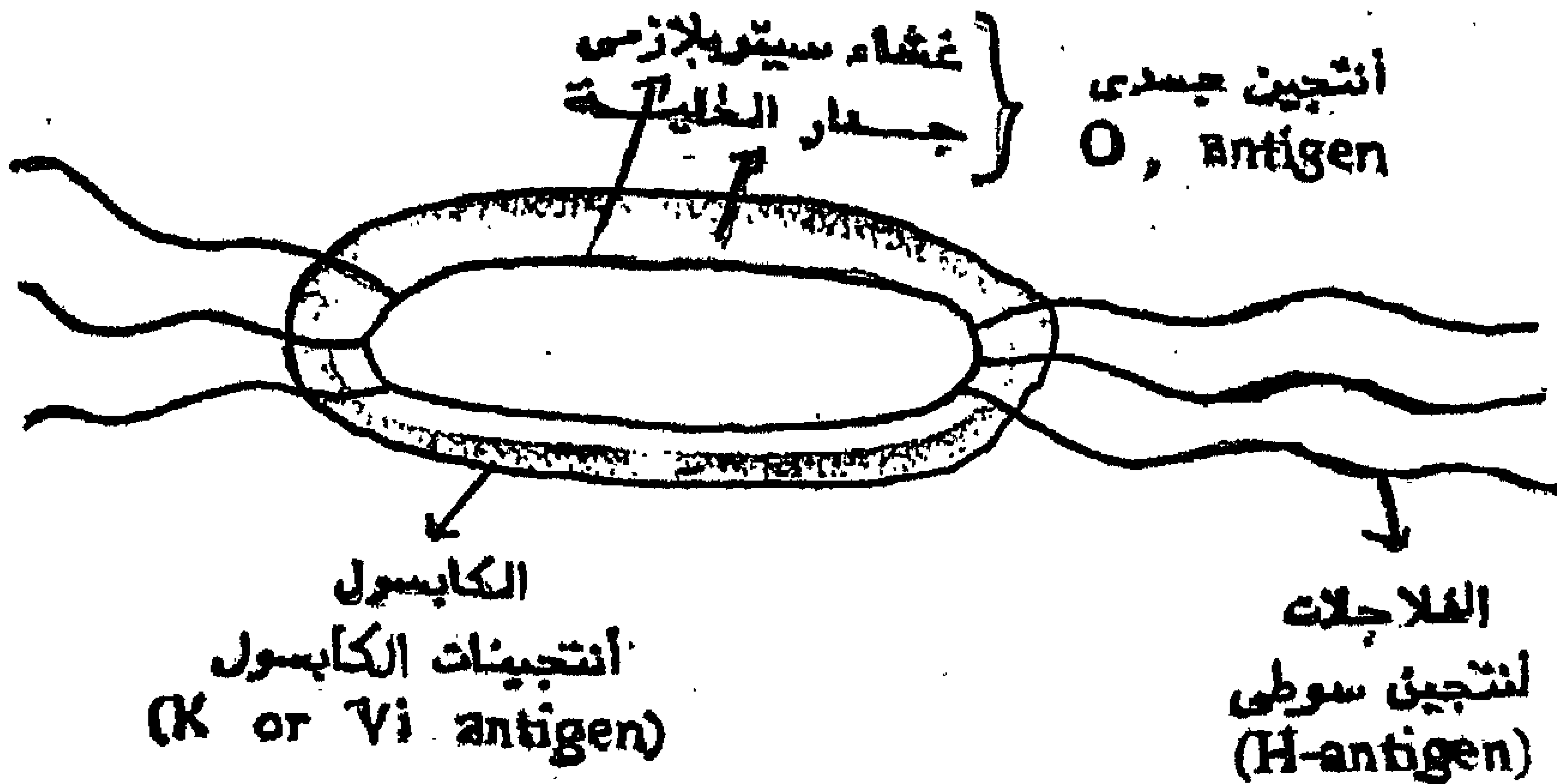
المضـــاد بشـــكل متخصص. لكي يكون للمادة خواصا أنتيجينية يجب أن تكون مادة غريبة عـــن الجسم ذات وزن جزيئي مرتفع (أكثر من ١٠ آلاف دالتون) قابلة للذوبان في بلازما الــدم. بعــض الأنتيجيــنات سكريات معقدة والغالبية العظمى بروتينيات. هناك بروتينيات ليســت أنتيجينية مثل الجيلاتين بسبب غياب بعض الأحماض الأمينية. هناك بعض المواد غــير أنتيجينية ولكنها بعد اتحادها مع البروتين تصبح قادرة على تكوين الأجسام المضادة (أنتيجينية) وتسمى الهاتبين أو Haptens مولدات مضاد غير كاملة وهذه توجد في عدد كبــير مـــن البكتريا. لكي تحدث المناعة المكتسبة لابد من اتحاد الأنتيجين والجسم المضاد كمـــا ســـبق القـــول. لكي يعمل الأنتيجين لابد أن تتوفر محددات هذه العمل وهي مراكز الـــتفاعل ذات وزن جزيئي منخفض حوالي إلف والتون وقد يصل عدد المحددات الى ألف أو أكثر وفي بعض الأحيان لا يزيد ٢ أو ٣. والمحددات هي التي تحدد تخصص الأنتيجين بســـبب طبيعة التركيب والشحنات الكهربية ومدى تطابق سطوح كل من الأنتيجين والجسم المضاد (شكل ٣-١)



شكل (٣-١): رسم تخطيطي يوضح مراكز التفاعل بين الأنتيجين والجسم المضاد.

هـــناك المـــواد المســـاعدة التى عندما تحقن بالجسم مع الأنتيجين تساعده في زيادة إنـــتاجه مـــن الأجســـام المضادة مثل الشبه وأملاح الألومنيوم والجينات الصوديوم وكذلك التوكســـينات الداخلية للبكتريا. توجد إنتيجينات طبيعية ذات أهمية طبية ومنها ما يوجد في أنســـجة جســـم الإنســـان وكـــرات الـــدم الحمـــراء مجاميع الدم والتوافق منه النسيجي ثم الأنتيجيـــنات البكـــترية والفيروســـية والبكتيرية متعددة إما أن تفرز خارج خلية البكتريا كأنزيمات أو توكسينات خارجية أو توجد بداخلها مكونة لأحد مكوناتها الداخلة في تركيبها الخلوي (شكل ٣-٢).

لقـــد ذكرت الطرز السيرولوجية لبكتريا الباسيلليس فى أكثر من موضع لذلك رأيت أن أحدد المقصود بالسيرولوجى والسيرولوجية والتشخيص السيرولوجيه من المعروف أنه لا يمكـــن رؤية الأجسام المضادة بالعين المجردة ولكن يمكن التعرف عليها من التفاعلات الـــتى تـــتم بيـــنها وبين الأنتيجين الذي أنتجها. تجرى هذه الاختبارات في المعمل وتسمى اختـــبارات ســـيرولوجية وهى أفضل دليل عن وجود أو عدم وجود أجسام مضادة بسيرم الـــدم. مـــن هذه الاختبارات التجمع والترسيب وتحلل الخلايا وتفاعلات المكملات وتسهيل الألـــتقام ومعادلـــة الســـموم الميكروبـــية ومعادلة الفيروسات. فى الوقت الراهن تستخدم الاختـــبارات السيرولوجية بكثرة لأغراض متعددة مثل التعريف السيرولوجى للميكروبات ودراســـة تكويـــناتها الأنتيجينـــية والتعرف عليها وقياس الاستجابات المناعية والتشخيص الســـيرولوجى المعملـــي للأمراض المعدية وفى الدراسات الخاصة بالدم وقد تطورت هذه الاختـــبارات كثيرا باستخدام النظائر المشعة والأنزيمات والصبغات الكلورينية (مأخوذة من كـــتاب الميكروبيولوجـــيا التطبيقية الصادر عن المكتبة الأكاديمية، ١٩٩٦ جمهورية مصر العربية).



شكل ٣-٢: الأنتجينات الداخلة بتركيب بكتريا سالبة لصبغة جرام مثل السالمونيلا.

الفصل الأول

ثبات ونشاط مستحضرات الباسيلليس Bt فى البيئة

تــراكم وثبات الباسيلليس Bt والتوكسينات التي تنتجها قد تؤدى الى حدوث أضرار بيئــية كمــا هــو الحال مع التعرض الزائد للأنواع غير المستهدفة وانتخاب أنواع الآفات المقاومة للتوكسين. مآل ومصير Bt في البيئات الخارجية معروف فقط في حدود المعرفة الخاصة بالنواحي العامة مثل: التوكسينات عادة تفقد فعاليتها خلال أيام فى منطقة المجموع الخضري والتربة بينما الجراثيم الداخلية تستطيع البقاء فى التربة لفترات طويلة من شهور وحــتى ســنوات. تســتطيع البكــتريا التضاعف بشكل كبير فى الأماكن المناسبة لمعيشة الكائــنات الدقــيقة ومن بينها اليرقات المستهدفة. حيث أن الأمراض الحيوانية الطبيعية لا يمكــن أن تحدث فى الخارج outdoors على عكس مخازن السلع الاستوائية فأن يصعب فهم كيفية موائمة البكتريا Bt وصيانة معيشتها فى البيئة الخارجية. من الاحتمالات الممكنة حــدوث النمو والتجرثم خارج الحشرة العائل كما فى التربة الغنية بالمغذيات. توازن الأدلة أدى إلى الاقتراح بأن مجاميع Bt فى التربة المدعمة صناعيا يحدث لها خفض متفاوت إلى مســتويات غير ضارة. استمرار بقاء الباسيلليس Bt على المادة النباتية وفى الماء يجب أن يؤخــذ فــى الاعتبار عند تقييم خطر السمية على الكائنات غير المستهدفة. فى الماء تعانى Btمــن نقــص الثــبات مع قليل من النشاط يستمر لأيام قليلة بعد المعاملة. معدل اختيار مخــتلف منــتجات Btيــتأثر بالعديد من العوامل منها نوع المستحضر وطريقة ومعدلات التطبــيق والوســط الذي تستخدم فيه. العوامل البيئية مثل التعرض للأشعة البنفسجية تؤثر كذلــك على الثبات. السؤال الذي يطرح دائما مع المبيدات كان عن مدى الثبات ولأي فترة يســتحب أن يظــل المبــيد ثابتا فى البيئة وما قد يستتبع ذلك من تأثيرات مطلوبة أو غير مرغوبة.

الثبات في التربة Persistence in soil:

الــبقاء على صورة جراثيم: جراثيم الباسيلليس Bt تستطيع البقاء لفترات طويلة فى البيئة المحمية نسبيا للتربة. لقد تم تقدير نصف فترات الحياة تجريبيا ووجد أنها تتراوح فى العادة بيــن ١٠٠-٢٠٠ يــوم (هانســن وآخــرون ، ١٩٩٦). فى أحد التجارب الحقلية فى يوتا

بأمـــريكا ظلت جراثيم Bt التى سبق استخدامها لمكافحة الفراشة الغجرية فى الغابات دون أن تتضـــاعف ولكـــنها بقيت حية لمدة ٢٤ شهر تقريبا (سميث وبارى، ١٩٩٨). لم يحدث فقـــدا فى حيوية الديبيل ١٧٦ (باسيلليس كروستاكى) فى الأراضي الحامضة على امتداد ٨ أســـابيع عـــندما استخدمت بالمعدل الحقلي الموصى به (يكافئ ٨ر١ لتر/هكتار)(visser، وآخـــرون ١٩٩٤). لقـــد درس بيدرســـين وآخـــرون (١٩٩٥) حركية مجموع الباسيلليس كورســـتاكى فى حقول الكرنب ووجد أن نصف فترة الحياة زادت عن ١٠٠ يوم فى الطبقة العليا من الأرض.

أنـبات الجراثـيم والنمو فى التربة: بينما سجل نمو خضري في الأراضي المعقمة مرات عديـدة إلا أنه في وجود كائنات دقيقة أخرى تتجرثم Bt بدلا من النمو الخضري (yara ، وآخرون ١٩٧٧). لقد قام الباحثان بتيراس وكاسيدا، (١٩٨٥) بتحضين Bt المتاحة تجاريا فـــى الـــتربة الطبيعية ووجدا نقص يقارب ١ لوغارتيم فى الأسبوعين الأولين ولكن كانت أعداد الجراثيم ثابتة نسبيا على امتداد ثمانية أشهر. أذا أضيفت الخلايا الخضرية للتربة فأن هـــذه الخلايـــا تستمر فى البقاء والمعيشة لمدة ١–٢ يوم فقط (بتيراس وكاسيدا ، ١٩٨٥ ، أكيـــبار ١٩٨٦–١). لقـــد خلـــص العديد من الباحثين إلى أن استمرار المعيشة في التربة يـــرجع إلـــى نقص أنبات الجراثيم (West وآخرون، ١٩٨٥). بالنسبة للباسيلليس Bt فأن توفـــر الغذاء يبدو أنه العامل الأكبر المحدد للنمو فى التربة. بينما لا تستطيع Bt أن تنمو تحـــت ظـــروف التربة فأن من بعض الحالات يبدو أن Bt تنبت وتنمو فى التربة ولو أن الدلـــيل على هذا الحدوث محدود. لقد أظهر صالح وآخرون ، (١٩٦٩). أن الجراثيم نبتت ونمـــت وتجرثمـــت فـــى الأراضي ذات المجموعة المتعادلة والتي عدلت مع البرسيم أو الكازين. فى دراسة أخرى لم تعيش الخلايا الخضرية فى الأراضي الحامضة. جراثيم Bt كانت قادرة على الإنبات فى الأراضي المعقمة وليس فى الأراضي غير المعقمة (Akiba ، ١٩٨٦–أ). لقـــد حدث النمو فى الأرض المعقمة مع حموضة ٥، ٥ – ١، ٧ ولكن ليس مـــع حموضة أكل من ٤، ٥ (Akiba، ١٩٨٠). على نفس المنوال وجد West وآخرون، (١٩٨٥) حدوث خفض فى النمو عند درجة حموضة ٢، ٥ بالمقارنة بحموضة ٣، ٧. لقد أوضـــح West and Burges ، (١٩٨٥) أن تعديل التربة بمواد عضوية مختلفة أثر على نمـــو ومعيشة الباسيلليس. التربة التى أضيف إليها النجيل الجاف حدث بها زيادة ٢٢ مرة

فـــى خلايا Bt فى التربة على امتداد ما يزيد عن ٦٤ يوم بينما أدى سماد مخلفات الفراخ الى خفض حيوية Btإلى ٠,٢٢ مرة عن المستوى الأصلي.

ثـبات فعالية ونشاط توكسين الباسيلليس Bt: أن المعلومات المتوفرة عن مصير أو مآل التوكســينات الـــناتجة مـــن تحت أنواع الباسيلليس Bt فى التربة محدودة وهى تشير فى مجملها الى الاختلاف العريض والكبير فى ثبات توكسين Bt فى البيئة. لقد فتح ذلك مجال جديـــد فـــى البحث والدراسات فى اتجاه الكائنات المهندسة وراثيا التى تعبر عن توكسينات Bt. هـــناك بعـــض الأدلـــة تفيد بأن ارتباط توكسينات Bt بالأحماض الدبالية والمضـافات العضـــوية أو علـــى جسيمات التربة تحمي التوكسينات من الأنهيار بالميكروبات دون أن تؤثـــر على نشاطها الأبادى ضد الحشرات (West، ١٩٨٤، Koskella and stotzloy، ١٩٩٧). لقد وجد أن التوكسينات من الباسيلليس كورستاكى والتينيبريونيس تدمص بسرعة وترتـــبط بشـــدة على معادن الطين والمونتموروليننيت والكاؤولينيت وعلى عناصر الطين المفصولة من التربة (Tapp and stotzky، ١٩٩٥) وعلى الأحماض الدبالية المستخلصة مـــن الـــتربة. لقد تم الاحتفاظ بالنشاط الإبادى على الحشرات عندما تم تحضين توكسينات الباســـيلليس كورســـتاكى فى التربة ولكن كمية الأرتباط اختلفت مع نوع التربة. لقد ظلت التوكســـينات الـــتى أضيفت للتربة المعدلة بالكاؤولينيت سامة على يرقات "ماندوكاسيكستا" لمـــدة تزيد عن ستة شهور بينما نفس التربة المعدلة بالمونتموروليننيت أظهرت خفض فى الفاعلـــية ضـــد الحشرات بعد ٣٥ يوم فقط. لقد كانت درجة حموضة الأراضي التي حدث فـــيها خفـــض فى الفاعلية ضد الحشرات عالية (٨، ٥ – ٣، ٧) عن الأراضي التي ظلت الفاعلـــية الأبادية ضد الحشرات كما هى (٩، ٤ – ١، ٥). حيث أن النشاط الميكروبي فى درجـــات الحموضة العالية كان عاليا فأن الميكروبات فى التربة ذات الحموضة العالية قد تهـــدم كمـــيات مـــن التوكســـينات أكثر. لقد أشار تاب وستوتزكس، (١٩٩٨) الى وجود احـــتمالات لـــتراكم توكســـينات Bt فى الأرض والاحتفاظ بفاعليتها ضد الحشرات خاصة عندما ترتبط على معادن الطين أو الجسيمات خاصة فى الأراضي ذات درجات الحموضة المنخفضة.

لقـــد أشـــارت الدراسات الأولى الى مدى من تقديرات ثبات فاعلية التوكسين بالرغم مـــن عدم القيام بالتمييز بين التوكسينات والجراثيم. لقد درس Pruett وأخرون ، (١٩٨٠)

ثبات جراثيم الباسيلليس جاليريا والتوكسينات فى المعمل تحت نظام بيئي مصغر "ميكروكوزم" على درجة ٢٥°م. لقد انخفضت حيوية الجراثيم على امتداد ١٣٥ يوم حيث نقصت بمقدار ٢٤% من الأعداد الأصلية بينما نقصت السمية على دودة الشمع الى أقل من ١%. لقد أدى ذلك الى الأقتراح بحدوث أنهيار سريع فى التوكسين النقى عما هو الحال مع الجراثيم وقد تأكد ذلك بواسطة West وآخرون ، ١٩٨٤. النشاط الباقي الفعال للتوكسينات من Bt اليابانية (كما قيست بواسطة التقييم الحيوي من يرقات أنومالا كوبريا) كان طويلا وممتدا من الأراضي من حقول البطاطا وأماكن نجيل الزينة حتى ٤٠ يوما (سوزوكى وآخرون ، ١٩٩٤). فى دراسة على الباسيلليس كورستاكى و Bt تينيبريونيس فى التربة الطينية دام النشاط الأبادى ضد الحشرات لأكثر من ٤٠ يوم فى الأرض غير المعقمة. لقد وجد وسيت وبيرجيز، (١٩٨٥) أن النشاط الأبادى ضد الحشرات للباسيلليس على صورة بلورات الجراثيم الخارجية نقص بشكل أسى فى أرض النجيل وتلك المضاف لها السماد البلدي مع نصف فترة حياة حوالي ٥، ٩ ، ٥، ٨ أيام على التوالي. تجدر التذكرة بأنه فى معظم التجارب فإن جراثيم وبللورات Bt كانت تضاف فى البداية الى التربة بتركيزات أعلى كثيرا من تلك المطلوبة لمكافحة اليرقات فى الفيلوسفير حتى يمكن قياس الانهيار مع الوقت. فى الحقل فأن Bt التى تستهدف الفيلوسفير سوف تصل الى التربة وتصبح مخففة جيدا تحت المستويات التى تحدث إبادة للحشرات. الانهيار فى التربة قد يزيد من المعدل المطلوب من تكرار رش المجموع الخضري ولذلك فأن مجاميع Bt التى تصل الى التربة سوف تنهار مع الوقت الى المستوى الطبيعي المتذبذب.

استمرار سمية الدلتا – أندوتوكسينات الفردية للباسيلليس Bt فى النباتات سجلت مع بروتين Cry 2A فى القطن مع نصف فترة تثبيط النمو ضد دودة اللوز الأمريكية حوالي ١٥-٣٠ يوم (Sims and Ream ، ١٩٩٧). لقد وجد Palm وآخرون، (١٩٩٦) توكسين منقى للباسيلليس كورستاكى أو توكسين مكبسل فى أوراق القطن المعدلة وراثيا فى التربة بعد ١٤٠ يوم.

الثبات على المجموع الخضري Persistence on foliage

البقاء والمعيشة كجراثيم: نصف فترة حياة جراثيم Bt فى منطقة الفيلوسفير وجدت أقصر كثيرا عما هو الحال فى التربة. لقد أثار هانسن وآخرون، (١٩٩٦) أن نصف فترة

الحـياة المقـدرة كانـت فـي مدى أقل من ١-٣ أيام وقد أيدت هذه التقديرات من خلال الدراســات الحقلــية. لقد وجد الباحث بيدرسون وآخرون، (١٩٩٥) أن نصف فترة الحياة الابتدائية (في الأسبوع الأول) كانت ١٦ ساعة مع الباسيلليس كورستاكى التى عوملت على أوراق الكرنب مع نقص بمقدار ٥ وحدات خلال الأسابيع الأربعة الأولى بعد الرش. على نفـس المنوال استخدمت جراثيم Foray UB على ابر نبات الصنوبر فى ليتونيا وقد وجد حدوث نقص فى أعدادها فى اليومين الأولين ووصلت نسبة الموت فى البكتريا ٦٨% بعد يومان على الصنوبر وزادت الى ٨٨% فى اليوم الخامس. لقد وجد موريس ١٩٧٧-أ أنه عـند اسـتخدام الديبيل 36B على الصنوبر الأبيض وشجرة البلسم ووجد أن نصف فترة الحـياة للجراثيم على القطن اختلفت من ٧٥-٢٥٦ ساعة اعتمادا على المستحضر (سلامه وآخرون، ١٩٨٣-ج). لقد قام سميث وبارى (١٩٩٨) بدراسة ثبات الباسيلليس كورستاكى بعد المعاملة فى يوتا (٧٢ بليون وحدة دولية لكل آكر لكل سنة على امتداد خمسة سنوات) بغـرض استئصـال الفراشة الغجرية. لقد وجد الباحثان أنه بينما تثبت الجراثيم فى التربة حـتى سـنتان إلا أنه لم يكن هناك اختلاف بين أعداد جراثيم Bt على الأوراق المرشوشة وغـير المرشوشة التى أخذت عيناتها بعد ١٢ شهر من المعاملة. لقد وجد مدى واسع من الطرز الوراثية من Bt بما فيها السلالة التى استخدمت على الأوراق.

أن كيمـياء سـطح الورقة (درجة حموضة مرتفعة أو وجود أنزيمات البروتينزيس والألليلوكيميائيات) قد تؤدى إلى انهيار البروتين البللورى. التركيب الدقيق والبيئات الدقيقة الطبيعـية والكيميائـيات لسطوح الورقة تختلف بشكل عريض بين أنواع النباتات (بيرجز وجوتـز، ١٩٩٨). لذلـك فـأن الاختلاف فى ثبات Bt على الأنواع النباتية المحتلفة غير مـتوقع. لقـد وجد الباحث بينوك وآخرون، (١٩٧٥) أن معدلات الاستقرار الابتدائية وما يسـتتبع ذلك من ضياع حيوية الجراثيم تختلف بشكل مؤكد بين أربعة أنواع من الأشجار. أوضـحت العديـد من الدراسات التى أجريت على أوراق الصنوبر أن امتداد معيشة Bt لمـدة أطول عما لو كانت على أوراق الأشجار. عندما استخدمت الباسيلليس كورستاكى (Foray 48B) علـى الصـنوبر لمكافحة الفراشة الغجرية فى بولندا وجد أن الجراثيم تم الكشـف عنها بعد ١٢١ يوم بعد المعاملة (Damgaard وآخرون، ١٩٩٦-b) بتركيزات أعلـى من التركيز المعروف على الصنوبر قبل المعاملة. أظهر التحليل الحيوي باستخدام

L.monacha اخـتفاء الفعل الأبادى على الحشرات على أوراق الصنوبر بعد ٢١ يوم من الرش بالرغم من استمرار تواجد الجراثيم.

وضع Bt على الأوراق يؤثر كذلك على الثبات. لقد تحلل الثوروسيد HPC ببطئ كبـير على الأسطح الخلفية للشوفان مقارنة بالأسطح العليا. لقد سجل دوام طويل للمعيشة بشـكل عرضي كما في استرجاع الجراثيم الداخلية الحية من أوراق الصنوبر التى جمعت بعد سنة من المعاملة.

ثـبات نشـاط توكسـينات الباسيلليس Bt: ثبات الفعل الأبادى ضد يرقات الحشرات مع الجـرعات الموصـى بهـا درس جيدا حيث أن دوام فعالية البللورات تتأثر تماما بواسطة الأشـعة فـوق البنفسجية فى ضوء الشمس بدرجة أفضل مما هو الحال مع الجراثيم، فأن النشاط الأبادى المسجل ضد اليرقات يعكس نشاط البللورات لأن أعداد الجراثيم الحية يمكن أن تقـل بصـورة واضـحة دون أن تـنخفض الفعالـية ضد معظم الحشرات فى منطقة الفيلوسـفير فـأن نصـف فترة حياة التوكسينات تكون قصيرة لأقل من واحد يوم (هانسن وآخـرون ، ١٩٩٦) وقـد أظهـرت العديد من الدراسات الحقلية نشاط باقي قصير على المجمـوع الخضري بينما أظهرت دراسات أخرى استمرار دوام معيشة Bt لمدة أطول. مـن الواضح أنه توجد أسباب عديدة تؤثر على ثبات نشاط التوكسينات. لقد استخدمت هذه الدراسات مستحضرات مختلفة محسنة بهدف زيادة استمرار المعيشة والثبات بشكل أفضل كما ذكر سابقا فأن الوسط يؤثر بشكل مباشر على المعيشة والدوام.

الثبات على الأشجار: لقد وجد الباحثان فرانكينهويز ن ونستروم ، (١٩٨٩) أن المستحضر المائـي عالي الفاعلية للباسيلليس Bt (ثوروسيد 48 LV) أظهر سمية ذات أثر باقى على C. Fumiferana لأقل من يومان على الصنوبر (المجموع الخضري). أظهرت دراسات أخـرى أن النشاط الأبادى للحشرات يمكن أن يمتد على الأوراق لفترات أطول. فى تطبيق ميدانـي أجرى فى أمريكا لمكافحة الفراشة الغجرية أظهر رش Bt دوام الفعالية لمدة ٦٤ يوم على الأقل. لقد تم الكشف عن توكسينات Bt (من الثوروسيد 16B والديبيل 4L) على الأوراق بعـد ١٦ يـوم مـن المعاملـة واسـتمرت قـادرة على قتل الآفة. لقد استمرت

مستحضـــرات الديبـــيل 8L و Forny 48B فعالة لمدة ٦-٨ أيام على التوالي ضد حشرة T.Pity ocampa .

علـــى المحاصيل الحقلية: لقد تم تقدير دوام الحيوية والفعل الأبادى ضد الحشرات لبكتريا الباسيلليس على عدد من المحاصيل الحقلية. فى الغالب قدرت نصف فترة الحياة فى النشاط الأبـــادى ضد الحشرات بأنها أقل من ٢٤ ساعة. لقد وجد Ignoffo وآخرون ، (١٩٧٤) فقد ٦٥% من الفعل الأبادى ونقص ٩٠% من حيوية الجراثيم على أوراق فول الصويا فى الـــيوم الأول مـــن المعاملـــة ولـــو أن بعض النشاط الأبادى أستمر حتى اليوم السابع بعد المعاملة. على المجموع الخضري للطماطم واستمرت سمية Bt على دودة اللوز الأمريكية لأقل من ٤٨ ساعة بينما نقصت نسبة الموت بسبب Bt تيفيبريوينس (M-one) من ٨٥% على الطور الأول من حشرة L.decemlineata بعد ساعة من المعاملة إلى أقل من ٥% موت بعد ٤٨ ساعة (Ferro وآخرون ، ١٩٩٣). على نفس المنوال أحدث مستحضر M-Trak لنفس البكتريـــا ٩٠ % موت على نفس الحشرة بعد ساعة من المعاملة فى مقابل ٢٠ % مـــوت بعـــد ٧٢ ساعة. الدلتا – اندوتوكسين من Bt كورستاكى عندما عوملت بالرش الجـــوى والأرضي فى مزارع البيكان دامت فعالة لفترة قصيرة (Sundaram وآخرون، ١٩٩٧). لقد كان ثبات Bt أقل من أربعة أيام فى منطقة الفيللوسفير فى التوت والفاصوليا والفول السودانى والطماطم والأرز. لقد أستمر نشاط وفاعلية الثوروسيد HP ضد الثاقبات حتى ١٠ أيام من المعاملة. لقد كشف حامد وجود جراثيم بكتيرية حية من الديبيل بعد ١٠، ١٨ يـــوم بعـــد المعاملـــة وســـجلت نسبة موت ١٠٠% على يرقات العمر الثالث لحشرة Yponomeuta بعد ١٢ يوم من المعاملة بالديبيل والثوروسيد.

الحـــبوب المخـــزونة: مـــن الشـــائع اســـتخدام Bt ضد آفات الحبوب المخزونة. الحبوب المخـــزونة تمثل بيئة محمية ومن ثم يتحسن وضع ثبات نشاط وفعالية Bt مقارنة بالوضع علـــى المحاصيل. عندما عوملت حبوب القمح بالديبيل لم يحدث نقص ملحوظ فى الفاعلية ضـــد حشـــرة الـــبلوديا على امتداد سنة فى شونة المزرعة تحت ظروف حرارة متذبذبة (كيســـنجر وماجـــاهوى، ١٩٧٦). لقـــد ظل الثوروسيد (باسيلليس كورستاكى) فعال ضد الـــبلوديا علـــى الشوفان لأكثر من خمسة شهور على درجات حرارة ١٢-٢٨°م ورطوبة

نسـبية ٧٥% (شميدت، ١٩٧٩). لقد حققت الباسيلليس تورستاكى حماية لدرنات البطاطس ضـد هجـوم فراشة درنات البطاطس الفوثوريميا عندما استخدمت داخل المخازن لفترات أطـول من ٢٥٥ يوم (سلامة وآخرون، ١٩٩٥-ط). لقد آثار سلامة وآخرون (١٩٩٦-أ) الدلتا – أندوتوكسين والبيتاكو توكسين للباسيلليس كورستاكى تناقصت فعاليتها ضد يرقات الـبللوديا على الحبوب المخزونة ببطئ مع امتداد ١٥٠ يوم بينما التوكسين الخارجي بيئيا نقص للجرعة أكبر:

ثـبات الباسيلليس فى الماء : لقد أشارت معظم التقارير عن ثبات Bt فى الماء الي الفعل الأبادى ضد يرقات البعوض وتحت الأنواع السامة للذباب الأسود مثل Bt الإسرائيلية ولو أن بعـض الدراسـات تناولـت مآل ومصير الباسيلليس كورستاكى فى الماء. بعد الرش الجـوى للباسيلليس كورستاكى (ثوروسيد 16B) لمكافحة حشرة C. Fumiferana في غابـات كـندا الشـرقية إلى الكشف عن البكتيريا من الأنهار حتى ١٣ يوم بعد الرش مع فرضـية استمرار التسرب في الماء. أظهرت الدراسات المعملية أن جراثيم Bt كورستاكى تسـتطيع الاستمرار فى المعيشة فى المياه العذبة وماء البحر لأكثر من ٧٠، ٤٠ يوم على التوالـي علـى ٢٠°م. لقـد أشـار Buckner، (١٩٧٤) إلـى مستويات حوالي ١٧٣٠ جـرثومة/ملليلتر فى مياه النهر بعد معاملة Bt ولم يتم الكشف عن الجراثيم فى النهر بعد شـهر لاحقا. الباسيلليس الإسرائيلية يعانى من نقص الثبات فى الماء عند مقارنته بوسائل مكافحـة البعوض (مثل ميثوبرين ، تيميفوس). فى الماء وجد أن سمية هذه البكتريا تستمر فى أماكن معيشة وتغذية اليرقات لأيام وليست أسابيع. المستحضرات الأولى من الباسيلليس الأسـرائيلية لم يكن لها أثر باقي فعال ضد يرقات البعوض لأقل من يوم من المعاملة ولو أن الدلـتا – أندوتوكسـين تظـل ثابتة كيميائيا فى المياه المتعادلة والحامضة (Sinegre وآخرون، ١٩٨١-أ). الترسيب قد ينقص من ثبات الباسيلليس الأسرائيلية. لقد وجد شيران وفيشـر، (١٩٩٢). أن التقليب هو من أكثر العوامل الهامة فى صيانة الثبات لهذه البكتريا علـى صـورة خلايـا وكذلـك التيسر الحيوى لتوكسين الباسيلليس أسرئيلينسيز. فى هذه الدراسـة إتضح أن الترسيب ينقص الفاعلية ضد يرقات العمر الثالث للأبيدس إيجيبتى عن طـريق زيـادة أسـتقرار الجسـيمات السامة ولكنها لم تنقص الثبات لجراثيم الباسيلليس الأسرائيلية نفسها.

فـــى معظـــم الدراســـات اختفـــت فاعلية الباسيلليس الإسرائيلية خلال ١-٤ أسابيع (Mulla وآخرون، ١٩٨٥....) . أظهرت تجارب الميكروكوزم المعملية فى فرنسا على العمـــر اليرقى الرابع لبعوض الأييدس إيجيبتى أن المعلقات المجهزة من مستحضري Bt أسرائيلينسيز امتدت فاعليتها بترك اليرقات الميتة فى الماء وقد أصبحت كضحية أو فرائس للافـــتراس (Larget، ١٩٨١). علـــى العكـــس فأن مستحضر هذه البكتريا أكروب حقق مكافحة فعالة على امتداد ٤٧ يوم فى فلوريدا فى الأماكن التى تتراكم فيها اليرقات الميتة (بيكنل وآخرون، ١٩٩٦). الدراسات على نمو الباسيللس Bt. خارج الحشرة أظهرت قليل أو عـــدم الـــتكاثر حيـــث مـــن النادر أن تنتشر Btمن نقطة العدوي على الأرض ولو أن الكائـــنات غير المستهدفة مثل السمك (Snarski، ١٩٩٠) تقوم بنشر Bt اسرئيلينيسيز فى المـــاء. الافتقار إلى التدوير للباسيلليس فى مجاميع الحشرات أو نقص النمو فى الماء تقلل مـــن الثبات. أن وجود الكلورين الحر في الماء قد يثبط أو يحطم الأندوتوكسين وقد تأكدت علاقـــة عكســـية واضـــحة بين كمية الكلورين فى الماء وجدت اليرقات بسبب الباسيلليس اسرائيلينيســـيز. لقـــد وجد أن تركيزات الكلورين فى محاليل الباسيلليس بين صفر – ١٠٠ جـــزء فـــى الملـــيون ذات تأثير قليل على الفاعلية. لقد وجد أن كمية بقايا الكلورين التى تســـتخدم فـــى العادة لتنقية الماء لا تعتبر كافية لتحطيم جراثيم الباسيلليس كورستاكى. أن عـــزل جراثـــيم Bt من نظام أو شبكة توزيع المياه أثار تساؤلات عن تأثير عملية إضافة الكلـــور فـــى إعاقـــة تنشيط الباسيلليس كورستاكى فى نظام تنقية المياه. لقد وجد أن بقايا الكلوريـــن الكلى في حدود ٠٫٥، ١ مللجم/ لتر على الأقل مع فترة تلامس ٦٠ دقيقة مطلوبة لإيقـــاف نشاط ٩٩% من Bt كورستاكى في مياه الصنبور على درجة حموضـــــة ٢، ٧ مع ٢٠جم (مينون وماسترال، ١٩٨٥).

العوامل التى تؤثر على الثبات:

العوامـــل الحـــيوية Biotic factors: لقـــد نشر وأقترح العديد من الباحثين عن الانهيار الميكروبـــي للباسيلليس Bt كما أتضح من مقارنة الاختلاف فى نمو ودوام معيشة Bt فى الأراضـــي المعقمة فى مقابل الأراضي العادية (West وآخرون، ١٩٨١، أكيبا، ١٩٨٦-أ). هـــذا بينما لم يجد هاس وسكريبر (١٩٩٨) فرق فى دوام معيشة الباسيلليس كورستاكى علـــى الأوراق الـــتى أزيـــل لونهـــا (التبييض بالكلوروكس ٥%) والأوراق الغير مبيضة

المعاملـــة. قبل المعاملة بالتبييض صممت لإزالة المستعمرات الميكروبية من الأوراق. لقد وجـــد شيران وفيشر (١٩٩٢) أن التأثيرات التنافسية من الكائنات الدقيقة الأخرى لم تؤثر على ثبات بكتريا الباسيلليس أسرائيلينسيز فى الماء ولكن توكسين هذه البكتريا الداخلي تأثر عكسيا. لقد ظهرت تقارير عرضية تشير إلى مرور Bt خلال أجسام الحيوانات أو الطيور بـــدون أن تفقد نشاطها. لقد قام سمرنوف ومقلويد ، (١٩٦١) بتغذية الطيور والفئران على جراثـــيم Bt ووجـــد أن نسبة كبيرة من الجراثيم استمرت فعالة بعد مرورها في الجسم. الخلايـــا الخضرية للباسيلليس .(Bt (Atcc 107 تناقصت بمقدار ٩٠% فى أربعة ساعات فـــى كـــرش الأبقـــار بينما لم تنقص أعداد الجراثيم حتى بعد ٢٤ ساعة (أوفر وهارثمان، ١٩٦٥). وجـــود الجمـــبري وغـــيرها فـــى المـــاء يقلل من الخفض الطبيعي للباسيلليس أسرائيلينســـيز عن طريق التقليب المستمر للجسيمات المعدية (.O'Brien Fry ، ١٩٩٦). وجـــود بعض القشريات مثل الجمبرى أنقصت من فعالة البكتريا الأسرائيلية فى الماء تحت بعض الظروف.

العوامـــل غير الحيوية Abiotic factors: هناك عدد من العوامل اللاحيوية مثل الإشعاع الشمســـي والحـــرارة والـــرطوبة تؤثر على ثبات Bt (ليونج وآخرون، ١٩٨٠). درجات الحـــرارة تؤثـــر على دوام معيشة Bt ولو أن الدرجات القاسية انخفاضا أو ارتفاعا قد تفقد الجراثـــيم نشـــاطها. أن نقـــص معيشة Bt في الحبوب المخزونة تتناسب طرديا مع درجة حـــرارة التخزيـــن لقد اتضح أن المطر يسبب نقص حاد فى فاعلية Bt على الأوراق. مع الديبيـــل استمر ٣١% فقط من الجراثيم الحية على الأوراق بعد مطر صناعي ١٠ ملليمتر وتتـــناقص الى ١٢% مع ٥٠ ملليميتر و ٦% مع مطر ١٠٠ ملليمتر. لقد أظهرت بعض الدراســـات أن الغســـيل بالمطر (أقل من ٦ ملليميتر) كان هو المسبب الأول للسمية الباقية عـــندما استخدمت الثوروسيد LV 48 على الصنوبر. محاكاة المطر ٣ ملليمتر أزالت ما يقـــرب من ٥٠% من بروتين الباسيلليس كورستاكى من المجموع الخضري. الغسيل يمكن أن يـــزيل المستحضـــر ومن ثم يمكن تقليل الفقد والانجراف بالغسيل بإضافة المواد المثبتة لمحلول الرش (بيرجز وجونز، ١٩٩٨).

لقـــد أظهـــرت الدراسات علي النظام البيئي الميكروكوزم أن الجسيمات المعلقة فى المـــاء تقلل لحد كبير من نشاط وفاعلية الباسيلليس أسرائيلينيسيز ضد يرقات البعوض. لقد

وجـد الـبحاث أن التوكسينات المرتبطة على جسيمات المادة تصبح أقل فى السمية بشكل غير عكسي. هناك بعض العوامل الأخرى التى تؤثر على ثبات الباسيلليس الإسرائيلية مثل التقليب وجودة الماء ومكوناتها مثل الملوثات وكذلك الظروف البيئية مثل درجة الحموضة وبدرجة أقل درجة الحرارة. لقد وجد الباحثان شيران وفيشر (١٩٩٢) أن التقليب هو أكثر العوامـل أهمـية فى صيانة ثبات جراثيم الباسيلليس الأسرائيلية والتيسر الحيوى للتوكسين الخـاص بهـا. فـى هذه الدراسة يعمل القاع من خلال الوراسب على تقليل الفاعلية ضد يـرقات العمر الثالث لبعوض الأيبدس إيجيبتى عن طريق زيادة ترسيب الجسيمات السامة ولكنه لا ينقص الثبات لجراثيم هذه البكتريا.

ضـوء الشـمس يسبب خفض كبير فى حيوية الجراثيم حيث وجد موريس ومور، (١٩٧٥) أن ضـوء الشمس أدى الى فقد نشاط جراثيم الباسيلليس كورستاكى بمقدار ٩٠% علـى أوراق الصـنوبر فـى يوم واحد. فى الظلام حدث فقد نشاط مقدراه ٧٨% فقط فى الجراثـيم خـلال ١٤ يوم. لقد أظهرت العديد من الدراسات حدوث فقد سريع فى الفاعلية ضـد الحشرات (خلال ساعات وحتى أيام) بسبب الانهيار بواسطة الأشعة فوق البنفسجية. مستحضـرات جراثـيم Bt والبللورات عندما جهزت فى صورة كبسولات معا على حامل نشـا خالـي مـن مانعات اختراق الأشعة فوق البنفسجية حدث فقد لحيوية جميع الجراثيم والنشـاط الأبادى ضد الحشرات D. nubilalis خلال أربعة أيام ولو أن النشا نفسه يعمل كحاجـز جزئي (ونكل وشاشا، ١٩٨٩). لقد قام الباحثان باجكى وشريف (١٩٨٩) بفحص تأثير التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV على ٧ أنواع من Bt ووجدا حساسية عالية فى معظمهـا مـع فقد النشاط زاد عن ٩٩% عند معدل واحد J/m^2 . هناك أستثناءات تتطلب جـرعة UV بيـن ١-٢ J/m^2 لأحداث فقد فى النشاط مقداره ٩٩% كما فى الباسيلليس الكـندية ، جالـيرى ، أنديانـا ، ثوميسـونى. كذلك يتوقع وجود اختلافات بين العزلات والسـلالات لـنفس تحـت أنواع الباسيلليس. أظهرت دراسة معملية على الثبات الضوئي للديبـيل AF 76 علـى المجمـوع الخضـري للصنوبر بعد فترات مختلفة من التعرض للإشعاع أن النشاط الحيوي يتناقص مع زيادة دوام التعرض للإشعاع وزيادة شدة الإشعاع. لقـد كانت نصف فترة الحياة تساوى ١، ٥ يوم مع شدة التشعيع القليلة فى مقابل ٩، ٣ يوم مع الشدة العالية.

بينما أظهرت عدد من التقارير أن التشعيع بال UV له تأثير سالب كبير على دوام معيشة جراثيم Bt فأن التأثير على التوكسينات غير واضح. تأثير الضوء على فقد النشاط يعتمد على طول موجة وشدة الضوء ووجود الأكسجين وطول مدة التعرض. لقد فشلت دراسات كثيرة في إيجاد أى تأثير من جراء التعرض لحزم قصيرة في مدى الأشعة فوق البنفسجية UV range على ثبات التوكسين أو قد يحدث انهيار بسيط. لم يتحصل بيرجز وآخرون، (١٩٧٥) على أى خفض في النشاط الأبادى على الحشرات لبللورات Bt ضد يرقات أبى دقيق بعد التشعيع بأشعة جاما أو للأشعة فوق البنفسجية ذات الموجات القصيرة. لقد وجد Pusztai ، وآخرون (١٩٩١) مدى أشعة الشمس التى تحطم التوكسين كانت في نطاق ٣٠٠-٣٨٠ نانوميتر. لقد وجد ساندر أم وساندرأم، (١٩٩٦) أن مستويات البروتين الكلى لم تنقص مع زيادة دوام التعرض للتشعيع أو مع زيادة شدة الإشعاع على أوراق الصنوبر ولو أن التحليل الحيوى ضد الحشرات أظهر هذا النقص مما يوضح أن البروتين يفقد نشاطه ولا يتحطم.

لقد استخدمت الواقيات ضد الأشعة فوق البنفسجية UV Protectants لتحسين ثبات Bt عندما تستخدم تحت ظروف تحتم التعرض للأشعة وضوء الشمس. لقد قام الباحثان جريجو وسبنس (١٩٧٨) بفحص أى أطوال الموجات في ضوء الشمس أكثر تحطيما للباسيلليس Bt. لقد وجد الباحثان أن فقد نشاط جراثيم Bt بواسطة ضوء الشمس يرجع فى جزء منه الى الأطوال الموجية للضوء المرئي خاصة تلك الموجات القريبة من ٤٠٠ نانومتر والتى يسهل امتصاصها بواسطة الجراثيم. لقد درست Liu وآخرون، ١٩٩٣ تأثير إضافة المادة الماصة للأشعة فوق البنفسجية فى الضوء وهى الميلانين لتجهيز جراثيم وبللورات الباسيلليس الإسرائيلية. لقد أتضح من عدد الخلايا والتقييم الحيوي للنشاط الأبادى ضد يرقات البعوض أن الميلانين من أفضل المواد الواقية من الضوء Photoprotective agent.

تأثير المستحضر على الثبات Effects of Formulation

الشركات التى تنتج الباسيلليس Bt كمبيد حيوي تعانى من نقص الثبات كمشكلة تجابه استخدامات Bt وقد أجريت محاولات عديدة لتحسين الثبات من خلال تجهيز مستحضرات جديدة أو استخدام حاملات حيوية متنوعة (بيرجز وجونز، ١٩٩٨). مثال

ذلـك ما أعلنه العديد من الباحثين عن استخدام النشا لعمل كبسولات توكسينات الباسيلليس كورسـتاكي(ماكجوير وشاشـا ، ١٩٨٩، ماكجويـر وآخرون ، ١٩٩٦). لقد أظهرت مستحضـرات النشـا هذه صفات تخزين جيدة وزادت من الثبات لأكثر من أسبوعين على أوراق القطـن فـي الصـوب الزجاجـية ربما بسبب تحقيق الحماية ضد البيئة الكيميائية المعاكسـة على سطوح أوراق نباتات القطن (ماكجوير وشاشا، ١٩٨٩). لقد امتدت السمية فـي الحقـول ضـد الـيرقات الصـغيرة من ثاقبة الذرة عندما استخدمت كبسولات Bt كورسـتاكي المجهـزة بنشـا الـذرة في زراعات القطن بالمقارنة بالباسيلليس كورستاكي الـتجارية فـي السنوات الرطبة وليس في السنوات الجافة. لقد أستخدم Behle وآخرون، (B .١٩٩٧) جلوتيـن القمح المذاب حيث تمت إضافتة لمستحضرات رش Bt كورستاكي لتكويـن فلـيم يسـتطيع مقاومة الغسيل عند الجفاف. لقد أدت إضافة ١% (وزن : حجم) جلوتيـن الى المستحضرات الي زيادة كبيرة في تحمل درجات الحموضة المرتفعة عنه في حالة المستحضرات التقليدية مع مقاومة غسيل الباسيلليس كورستاكي بمطر صناعي ٥سم. لقـد أشار Boyant (١٩٩٤) أن رواسب الباسيلليس مع المادة اللاصقة قد تقاوم حتى ١٠ ملليمتر مطر دون حدوث فقد خطير في النشاط والفاعلية. المواد اللاصقة عبارة عن مواد إضافية تكون غلاف يرتبط بالراسب الجاف للباسيلليس على سطح الأوراق النباتية. سرعة المطر وأنهماره السريع تساهم لحد كبير في ثبات العديد من منتجات الباسيلليس كورستاكي فقد وجد ساندرام وآخرون (١٩٩٣) عندما اختبروا ثمانية مستحضرات لمعرفة دور انهمار المطر على الثبات حدوث فقد كبير من ٤٧-١٠٠% في البروتين.

لقـد تـم تقيـيم المستحضرات التي تعتمد على الكازين من حيث مقاومتها للأمطار (Behle وآخـرون ، ١٩٩٦). عـندما اسـتخدمت على أوراق القطن وتعريضها لمطر صـناعي وضوء شمس صناعي قاومت مستحضرات الكازين الغسيل وتم الأحتفاظ بأكثر مـن ٦٠% من النشاط ضد الحشرات الصغيرة من ثاقبة الذرة بالمقارنة بفاعلية ٢٠% مع تجهـيزات Bt الـتجارية من الكازين. لقد حققت مستحضرات الكازين حماية من الضوء والانهـيار المحفـز بالأليلوكيمياتـيات بالمقارنة بالباسيلليس غير المجهزة. من الاتجاهات الأخـرى لتحسين ثبات Bt تلك التي شملت التعبير عن جينات Bt والتوكسينات في بكتريا أخـرى وهـو الاتجاه الذي مازال في مراحله الأولى ولم ينجح على الدوام. لقد تم تطوير مستحضـر تجـارى MVP وهـو يتكون من بكتريا البسيدوموناس فلوريسنس المهندسة

وراثــيا للتعبــير عــن جيــن الدلتا-أندوتوكسين للباسيلليس كورستاكى حيث تقوم الخلايا البكتــيرية بكبسلة التوكسين. لقد أقترح بعض البحاث حدوث تحسين فى الثبات ولكن التقييم الحيوي للأوراق المرشوشة على يرقات العمر الثالث لحشرة بسيدوبلوزيا أنكلودنيس أظهر ثبات شامل للديبيل أفضل بكثير من ثبات MVP (Nyouki and Fuxa، ١٩٩٤).

نقــص ثبات الباسيلليس الإسرائيلية فى مناطق تغذية وتوالد البعوض فى الماء تمثل مشكلة كبيرة فى المكافحة، لذلك تم تطوير مستحضرات عديدة بهدف زيادة الثبات. تجهيز مستحضرات بطيئة الانفراد slow release حسنت من الثبات بدرجة فاقت المستحضرات الســائلة مما نتج عنه إطالته الفعالية فى برنامج المكافحة من أيام وحتى أسابيع فى بعض الحــالات. مثال ذلك مستحضر باكتيموس (Bt أسرئيلينسيز) الذى حقق مكافحة كاملة ضد الآيــيدس إيجيبتى فى ماليزيا حيث منع خروج الفراشات تماما من الماء لمدة ٧٥ يوم من المعاملــة (ســليمان وآخــرون، ١٩٩١). أن التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV تعتبر العــامل الأساســي المسئول عن نقص الثبات فى مستحضرات الباسيلليس ومن ثم أضيف للعديد من مستحضرات البكتيريا مواد واقية ضد هذه الأشعة. هذه قد تكون مركبات قادرة علــى امتصاص أشعة UV أو مواد مكبسلة. مازال البحاث يبذلون الجهد الكبير فى إيجاد مــواد واقية ضد الأشعة فوق البنفسجية. حديثا وجد راجى، (١٩٩٨) أن مركب Shellac واقــي ممتاز ضد الانهيار الضوئي يحقق الفاعلية ذات الأثر الباقي الطويل ضد الحشرات للباسيلليس.

طرق ومعدلات الاستخدام Application methods and rates

اختيار طريقة المعاملة على الأرض وفى الماء ذات أهمية كبيرة من ناحية الأخطار البيئية لأنها تحدد انتشار الباسيلليس ومدى تعرض الكائنات غير المستهدفة وحتى استقرار الجــرعة. يمكــن أجــراء التطبــيق عن طريق السكب فى الماء والرش (بما فيها الحجم المتناهــي فــي الدقــة) أو الــرش الجــوى وكذلك من خلال المستحضرات الخاصة مثل الكبســولات أو القوالب briquettes. لقد أستخدم الرش الجوى فى عمليات المكافحة خلال الحملات القومية وفى الغالب يستخدم تكنولوجيا الرش المتناهي فى الدقة ULV.

لقــد أوضــح ســاندرام وساندرام (١٩٩٦) أن حجم القطرة يؤثر على دوام فعالية الباســيلليس. لقد وجد أنه مع القطرات الكبيرة (٢٥٠ ميكروميتر) كانت نصف فترة الحياة

حوالى ٢٦ ساعة ضد الفراشة الغجرية بينما كانت مع القطرات الأصغر (٤٢ ميكروميتر) ١٢ ساعة فقط للباسيلليس. لقد كان الثبات على أوراق البلوط لقطرات أعلى من ١٣٠-١٦٠ ميكروميتر غير مرتبط بحجم القطرات. المستوى الأول للعدوى المستخدم قد يؤثر على ثبات الباسيلليس. المستويات العالية من العدوى قد يتطلب أنهيارها وقتا طويلا (بيكويث وستيلزر، ١٩٨٧) اللذان استخدما ٢٠ ، ٣٠ بليون وحدة دولية/ هكتار رش جوى بواسطة طائرات الهليكوبتر ضد حشرة C.occidentalis فى أوريجون. لقد أشار هذان الباحثان أن معدل فقد الفاعلية كان أقل أهمية من الموت الابتدائي لليرقات فى إنجاح تطبيقات الباسيلليس. على العكس من ذلك فأن الجرعات الزائدة من Vectobac 12 AS لم يطيل من دوام الفاعلية بشكل معنوي ضد يرقات البعوض ولو أن مجاميع الحشرات المعاملة لم تشفى وتصل إلى نفس المستوى بسبب زيادة الافتراس (Mulla وآخرون، ١٩٩٣).

الكشف عن الباسيلليس والتوكسينات فى البيئة

تراكم وثبات توكسينات الباسيلليس فى التربة وغيرها من أماكن المعيشة والتي تستخدم فى إبادة الحشرات قد تؤدى الى حدوث أخطار فى البيئة مثل السمية على أنواع غير المستهدفة والانتخاب تجاه تطور المقاومة فى الأنواع المستهدفة. لذلك فأن الطرق الحساسة للكشف عن الباسيلليس Bt وتوكسيناتها فى البيئة مطلوبة. يوجد العديد من الطرق تستخدم فى الكشف عن Bt فى البيئة. الكشف باستخدام الأطباق مع بيئة متخصصة تستخدم على نطاق واسع (مارتن وترافرز، ١٩٨٩). لقد طور اكيبا وكاتو،١٩٨٦. بيئة متخصصة لنمو الخلايا الخضرية للباسيلليس موريسونى و Bt ثورينجينسيز ولو أن الجراثيم لم تنبت عليها. لقد أعلن Yosuten وآخرون ، (١٩٨٢) عن بيئة خاصة للباسيلليس أسرئيلنيسيز. التوكسينات الأبادية ضد الحشرات يمكن قياسها بشكل غير مباشر باستخدام التحليل الحيوي نحو بعض الأفات المختارة مثل دودة الشمع. من الطرق الأخرى للكشف عن التوكسينات الداخلية اختبار الأليزا Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (تاكاهاشى وآخرون، ١٩٩٨) واستخدام المناعة بالفلورسنس (west وآخرون، ١٩٨٤). هذه الطرق لا توضح ما إذا كانت التوكسينات تعرضت لفقد النشاط لأن هذا يتم تحديده من خلال التحليل الحيوى. لقد قام الباحثان Tapp and stotzky،

(١٩٩٧) بتطوير استخدام الطريقة الخلوية المناسبة Flow cytometry كطريقة للكشف ودراسة مآل توكسينات الباسيلليس في التربة وهذه لا تتطلب الاستخلاص والتنقية. التوكسينات الباسيلليس كورستاكي و Bt يتنيربيونس ترتبط على الطين أو جسيمات السلت. لقد تم الكشف عن التوكسينات بقياس الفلورسنس بعد تحضين معقدات الجسيم توكسين مع الجسم المضاد في الأرنب لتوكسين Bt تينيبريونس ثم التحضين مع المضاد الفلوريسيني للجسم المضاد في الأرنب. لقد ثبت أن هذه الطريقة أكثر حساسية عن تلك التي سبق تطويرها بواسطة الأليزا dot blot Elisa

لقد استخدمت الطرق الجزيئية للكشف عن Bt. لقد أستخدم الباحث Damgaurd تفاعل سلسلة البوليميزيز (PCR) وبادئاته التي تستهدف جين Phosphatidylinositol – specific phospholipase للباسيلليس Bt للكشف عن البكتريا في التربة.

الفصل الثاني

العوامل البيئية وتلك المرتبطة بالحشرات التى تؤثر على سمية ونقل ونشر الباسيلليس

أولا: العوامل التى تؤثر على سمية الباسيلليس:

الباسيلليس بكتريا حية ترتبط ببللورات التوكسين الداخلي ومن ثم فهي تتعرض لعدد مـــن التأثـــيرات البيئية والحشرية. العديد من العوامل البيئية تقلل من الثبات وما قد يستتبع ذلـــك من تقليل الأخطار على الكائنات غير المستهدفة. فاعلية الباسيلليس قد تتأثر بالعوامل اللاحـــيوية ومثال ذلك أن الفاعلية فى الماء انخفضت فى ظروف الحرارة الواطية والجودة الواطـــية للمـــاء، هذا بينما العوامل اللاحيوية لم تؤثر على فاعلية الباسيلليس بنفس الدرجة كما فى الممرضات غير المنتجة للتوكسينات. العوامل الطبيعية فى المجارى المائية وعلى سبيل المثال النموات الخضرية الموجودة قد تؤثر كذلك على الفاعلية : هناك عوامل أخرى مثل الغذاء النباتي للحشرات وطور تطور الحشرة ذات تأثير أكبر على السمية. بوجه عام وجـــد أن الباســـيلليس Bt أكثر فاعلية ضد اليرقات الصغيرة عن اليرقات الكبيرة كما أنها ليست فعالة ضد كل الأطوار الحشرية. لقد أتضح أن نوع الورقة النباتية التى تتغذى عليها اليرقات ذات تأثير كبير على السمية حيث وجد أن لبعض النبات تزيد من السمية وتحفزها بيـــنما الـــبعض الأخـــر يثبط من سمية الباسيلليس. سلوك التغذية فى الحشرات يحدد كمية العـــدوى التى يتم تناولها والتي تؤثر بالتبعية على الحساسية. درجة الحرارة والرطوبة قد تؤثـــر علـــى تغذية الحشرات وعلى كمية العدوى التى تستهلك. هناك عوامل أخرى مثل الـــتوزيع بواســـطة الحشـــرات غـــير الحساسة والتي تؤثر على المساحة ومدى الكائنات الموجودة تحت الخطر بعد المعاملة بالباسيلليس .

العوامل البيئية : Environmental factors

لقـــد نوقـــش في الفصل الأول من هذا الباب تأثير العوامل غير الحيوية على ثبات التوكسينات والجراثيم وقد خلص الباحثون إلى أن الإشعاع الشمسي والمطر الساقط يعتبرا مـــن العوامل المحددة التى تقلل من ثبات الباسيلليس على النباتات والأسطح غير المحمية. درجـــات الحـــرارة والـــرطوبة ذات تأثير كبير على الفاعلية بدرجة تفوق تأثيراتها على الثـــبات. درجة الحرارة العالية تزيد من السمية حيث أنها تزيد من فعالية التوكسينات بوجه عـــام. الحـــرارة ذات تأثير أكثر أهمية على كفاءة الباسيلليس من خلال فعلها على الحشرة

حيث أن رفع درجة الحرارة يزيد من معدل التمثيل في الحشرة وكذلك المعدل الذي عنده تتغذى الحشرات وتستهلك Bt. رفع درجة الحرارة يسرع كذلك من تطور البكتريا داخل الحشرة. بوجه عام وجد أن Bt أكثر سمية على درجات الحرارة المرتفعة كما أنها تكون غير فعالة في الحقول التي تقل فيها الحرارة عن ١٥°م (فرانكين هويزن ١٩٩٠- ط) بسبب خفض التغذية بواسطة الحشرة المستهدفة. المنتج الروسي الأنتوباكتيرين Entobakterin (الذي يعتمد على Bt جاليرى) يفقد فعاليته ضد عدد من الحشرات على درجة حرارة أقل من ١٨°م (Sikura ، ١٩٧٦) كما أنه عديم الفاعلية ضد الفراشة الغجرية تحت ظروف متوسط حرارة يومي ١٣°م (korchagin ، ١٩٨٠). الحرارة المناسبة لأحداث السمية على يرقات الفراشة الغجرية حوالي ٢٥°م (Ghlani، ١٩٧٨). الباسيلليس كورستاكى لا تقتل يرقات دودة ورق القطن على ١٨°م في البيئة الصناعية في المعمل. مع حشرة ثاقبة الذرة وجد أن Bt (غير موصفه) سبب زيادة في نسبة الموت مع ارتفاع درجة الحرارة لأكثر من ٢٦°م وسجلت أعلى نسبة موت على درجة حرارة ٣٦°م (Sharma وآخرون ، ١٩٩٨).

ارتفاع درجة الحرارة ٢٦°م يزيد من موت يرقات الحشرات ومنها C.rosaceana التي تتغذى على أوراق التوت المعاملة بالباسيلليس كورستاكى في المعمل (Li وآخرون، ١٩٩٥). مع يرقات هذه الحشرة على أشجار البلسم أدت درجات الحرارة بين ١٣ ، ٢٥°م الى التأثير على إضطراد الموت وليس مستوى الموت التراكمي خلال ١٤ يوم من التغذية على الأوراق المرشوشة. لقد تناقصت الفترة اللازمة لقتل نصف اليرقات المعاملة LT 50 من ١٢-١٧ يوم على درجة ١٣°م الى ٢-٤ أيام على درجة ٢٥°م تبعا لكثافة القطرة (فرانكين هويز ن ، ١٩٩٠ – ط). لقد وجد نفس الباحث عام ١٩٩٤ أن تأثير الحرارة على إضطراد المرض ترجع الى تأثيره على تكبير وتضاعف الخلايا الخضرية في اليرقات المصابة. لقد كان الصنف السيرولوجى وهو Bt سان ديجو (= تينيبريونيس) أقل فعالية ضد العمر الأول من يرقات L.Decemlineata عند درجة حرارة ١٨°م بالمقارنة بدرجات ٢٨-٣٣°م.

درجة حرارة الماء لها نفس تأثير حرارة الهواء حيث تزداد السمية مع درجات الحرارة المرتفعة. معظم البيانات المنشورة عن حرارة الماء كانت مع البعوض وتحت أنواع الذباب الأسود مع المعاملة بالباسيلليس أسرائيلينسيز حيث أعطت الحرارة المنخفضة (٥°م) قيم LC_{90} ، Lc_{50} عشرة أمثال ضد البعوض في تجارب التقييم الحيوي بالمقارنة بالقيم على درجات الحرارة المرتفعة (٢٥°م) (بيكر وآخرون ، ١٩٩٢). بالرغم من أن

السـمية على البعوض انخفضت مع حرارة أقل من ١٩°م مع الباسيلليس الإسرائيلية إلا أن بعـض السمية قد سجلت مع درجات حرارة أقل من صفر درجة مئوية (ووكر، ١٩٩٥). هـناك بعـض التقارير عن تأثير حرارة الماء على سلالات Bt الأخرى. لقد زاد نشاط وفاعلـية الباسـيلليس دارستادينسيز ضد العمر الرابع من يرقات البعوض الكيوليكس مع زيادة درجة الحرارة بين ١٨-٣١°م (لاس واولداكر ، ١٩٨٣). الاختبارات المعملية التي أجريـت فـى الاتحاد السوفيتي سابقا أظهرت أن سمية مستحضر أندوباكتيرين (باسيلليس جالـيرى) ضـد يرقات بعوض الأيبدس فى الماء زادت مع زيادة درجة الحرارة مع نسب مـوت ٦، ٢٢ ، ٠، ٤٣ ، ٧، ٧٢% على درجات حرارة ١٥ ، ١٩ ، ٢٥°م على التوالي بعد ٤ أيام (سوبينوفا ، ١٩٧٣).

لقد أدى انخفاض الحرارة إلى تقليل كمية التغذية بواسطة الحشرات المستهدفة مثال ذلك أن حرارة الماء المنخفضة تقلل تغذية يرقات البعوض والذباب الأسود والذي قد يرجع مباشرة إلى المستويات القليلة عنف من الباسيلليس الإسرائيلية (ووكر ، ١٩٩٥). لم تتغذى يـرقات حرشـفية الأجـنحة كثيرا مع درجة حرارة أقل من ١٧ – ١٨°م وهذا قد يفسر مخرجات العديد من التقارير عن ضعف الفاعلية فى الحقول مع تجهيزات الباسيلليس على درجة حرارة أقل من ١٨°م (فيدنيوفا وآخرون، ١٩٨٠). قد يكون للرطوبة تأثيرات ضارة علـى سـمية الباسيلليس. لقد أتضح دور الأمطار فى غسيل جراثيم وبلورات البكتريا من علـى أوراق النباتات ولو أن رش الأوراق المبلولة فى المعمل بالباسيلليس Bt لم تخفض مـن السـمية علـى يرقات الحشرة C. Fumiferana بعد يوم من المعاملة بالمقارنة مع السمية على المجموع الخضري الجاف. على العكس من ذلك وجد عفيفى ومطر (١٩٧٠-ط) أن نقـص الرطوبة فى بيئة تربية حشرة إيفستيا كوهينيلا زادت من نسبة الموت بسبب بكـتريا Bt (بيوسـبور ٢٨٠٢) ولكن هذا التأثير لا يرجع للتأثير المباشر لتغيير الرطوبة علـى الـيرقات. بوجـه عـام وجد أن الرطوبة تغير من فاعلية Bt ولكن أقل مما تحدثه الحرارة وقد يرجع ذلك بداية إلى الفعل على المعدل الذي عنده تتغذى الحشرات أو تتطور.

سلوك تغذية الحشرة Insect Feeding behaviour

لقـد أتضـح أن العديد من الحشرات تميل الى الحركة من الأوراق النباتية الملوثة بالباسـيلليس Bt عما هو الحال مع الأوراق غير المعاملة أو أوراق المقارنة المعاملة وفى بعـض الحالات أتضح أن مستحضرات Bt أو البللورات ذات فعل طارد لتغذية الحشرات. أظهـرت يرقات الدودة القارضة حديثة الفقس وتلك ذات العمر الثالث تجنب واضح للغذاء

المعامل ببكتريا Bt (cry Ic) (بيرديجو وآخرون ، ١٩٩٦). أظهرت العديد من الدراسات الأخرى أن يرقات الدودة القارضة تتجنب الطعام الملوث بمركبات Bt . فى اختبار الاختيار التفضيلى choice test تجنبت يرقات L. dispar الغذاء أو أوراق البلوط المعاملة بالباسيلليس. عندما قدمت أقراص أوراق البلوط الى يرقات الحشرة بعد معاملة الأوراق بالبلورات فقط أتضح فرق فى التغذية بالمقارنة بأقراص الأوراق المعاملة بالماء فقط. لقد خفضت Bt بشكل معنوي من معدل التغذية على أوراق الكرنب لحشرة بلويتللا زيلوستيلا و L.decemlineata (هوى وهاك، ١٩٩٣). يرقات دودة اللوز الأمريكية حديثة الفقس تجنبت الأوراق النباتية المعاملة بتركيزات متوسطة وعالية من التوكسينات فى اختبار الاختيار مع الباسيلليس كورستاكى (جولد وأندرسون ، ١٩٩١). لقد تجنبت يرقات حشرة ماميسترا براستيا الأوراق المعاملة بالباسيلليس Bt (باكتوسبين) (Espinel ، ١٩٨١)، على النباتات فقدت يرقات العديد من الحشرات التوافق والاتساق عندما أكلت أوراق نباتية مرشوشة بلورات الباسيلليس وأصبحت فائقة النشاط مع ميل للسقوط من على النباتات مما يؤدى الى حصول اليرقات على جرعات تحت مميتة.

على العكس لم تتجنب يرقات العمر الرابع من خنفساء كلورادو البطاطس أوراق البطاطس المعاملة بالباسيلليس تينيبريونيس فى اختبار الاختيار التفضيلي كما أنها لم تترك الأوراق غير المعاملة مع المعاملة (فيروولبون ، ١٩٩١). الباسيلليس تينيبريونيس (Novodor Fc) لم تطرد هذه اليرقات من التغذية فى المعمل وكذلك فى التجارب الحقلية في نيوجرسي (شيديو وآخرون، ١٩٩٦). اليرقات والحشرات القاتلة لخنفساء الكلورادو لم يحدث لها تأثير سلوكي طارد بل أنه فى بعض الحالات كانت تحدث زيادة ونشاط ابتدائي فى التغذية مع وجود مستحضر M-one (باسيلليس تينيبر يونيس مكبسل فى خلايا البسيدوموناس) على الأوراق. فى الماء فأن المنطقة التى تتغذى فيها الحشرات قد تحدث عند التعرض لمستويات مختلفة من العدوى بالباسيلليس مثال ذلك أن الكيوليكس تتغذى عادة فى عمود الماء بينما أنواع بعوض الأيبدس يتغذى على مواد فى الوسط وهذا يعنى أن هذين الجنسين سوف يتناولان معدلات مختلفة من الجسيمات المستقرة للباسيلليس الإسرائيلية. أنواع الأنوفيليس تتغذى بداية عند السطح بينما البكتريا الإسرائيلية تبقى لفترة قصيرة من الوقت فقط (Mulla ، ١٩٩٠) ومن ثم فهي تتعرض لفترات قصيرة عن الأنواع التى تتغذى فى محيط الماء كله بالإضافة إلى ذلك فأن معدلات الترشيح تختلف بين الأجناس والأنواع مثال ذلك ما قام به Aly، ١٩٨٨ من قياس معدلات الترشيح فى ثلاثة أنواع من البعوض ووجدها ٦٣٢ ملليلتر/يرقة/ساعة مع الأيبدس، ٥١٥ للكيوليكس

كوينسكياش أو ٩، ٨٣ مع الأنوفيلس البيسانس. هذا أدى الى تأثير مفاده أن أنواع الأنوفيلس أقل حساسية بوجه عام للباسيلليس الإسرائيلية عن أنواع الكيوليكس أو الآييدس.

لقد أقترح محمود (١٩٩٨) أن يرقات الآييدس كانت أكثر حساسية للباسيلليس الإسرائيلية عن الأنوفيلس بسبب معدلات التغذية الأسرع. الأييدس تتناول ٥، ١١ مرة من الجراثيم أكثر مما تتناوله الأنوفيلس مما يؤدى إلى قيم قليلة منخفضة لمعيار LT_{50} (الوقت اللازم لقتل ٥٠% من اليرقات).

فى دراسات حقلية عن تأثيرات الباسيلليس كورستاكى غير المستهدفة وجد Wagner وآخرون، ١٩٩٦ تأثيرات قليلة على بعض حرشفيات الأجنحة الدقيقة وهذا يرجع إلى سلوك التغذية ومكان المعيشة بدرجة أكبر من الحساسية الواطية للباسيلليس. اليرقات التى لم تتأثر تقوم بلف الأوراق والاحتماء فيها أو تحفر فى النباتات مما يقلل من تأثيرات جراثيم وبللورات الباسيلليس.

عوامل التربة Soil Factors :

كما ذكر قبلا فأن الباسيلليس Bt قد يرتبط مع جسيمات التربة مما يقلل من كمية التوكسين المنهار وزيادة السمية الباقية. مثال ذلك فأن Bt كورستاكى ، Bt تينيبريونيس تدمص بسرعة (٧٠% من الأدمصاص تحدث خلال ٣٠ دقيقة) على سطح جسيمات الطين وقد فشلت عملية الغسيل بالماء فى إزالة الكثير من المادة المدمصة (Topp وآخرون ، ١٩٩٤). لقد كانت التوكسينات المدمصة لهذين النوعين من الباسيلليس سامة على اليرقات من حشرات ماندوكاسيكستا وخنفساء كلورارو البطاطس وفى بعض الأحيان يؤدى الارتباط على سطح حبيبات الطين الى تحفيز النشاط الإبادى ضد الحشرات (تاب وستوتزكى، ١٩٩٥). لقد اتضح أن إدمصاص توكسين الباسيلليس كورستاكى كان أعلى فى التربة الطينية عما هو الحال مع التربة الرملية (ساندرام، ١٩٩٦). لقد وجد كلينر وآخرون (١٩٩٨) علاقة بين نتروجين التربة ، تقليل وزيادة فعالية توكسين Cry I Aa ضد الفراشة الغجرية على أوراق الحور. التيسر القليل للنتروجين زاد من موت اليرقات وأطال من فترات التطور فى يرقات العمر الثانى التي تغذت على الأوراق المعاملة بالأندوتوكسين للباسيلليس Cry 1 Aa.

عوامل الماء Water Factors:

بالإضافة إلى عوامل الحرارة وكثافة الحشرات ومستوى العدوى التى نوقشت قبلا وجد أن العوامل التى تؤثر على كفاءة الباسيلليس فى الماء هي درجة الحموضة والملوحة

وجـودة المـاء. لقد تباين تأثيرات رقم الحموضة PH على الفاعلية ولكن بعض البحاث أشـاروا إلـى أن زيـادة حموضة الماء تزيد من موت الحشرات المستهدفة. مثال ذلك أن موت حشرة Simulim التي تسببت بواسطة Bt الأسرائيلية زاد مع الحموضة. الاستجابة لرقم الحموضة تختلف بين أنواع الحشرات. لقد كان مستحضر الأنتوبكتيرية (Bt جاليرى) ضـد يرقات الأييدس كاسبيس أكثر سمية على درجة حموضة (٧) عنه مع حموضة (٤) بالـرغم مـن أن الحموضـة كانـت ذات تأثـير قليل على أنواع calicoides و غيرها (سـاوبينوفار ١٩٧٣). أظهـرت الاختـبارات الحقلـية ضد الكيوليكس ترساليس أن كل مستحضـرات الباسيلليس الإسرائيلية كانت أقل فاعلية في الماء ذات الحموضة الأعلى من ٨ (Mulla وآخرون ، ١٩٨٠).

لقـد أشارت الدراسات استجابات مختلفة للملوحة. عند مستويات ٤، ١٤ ، ٦، ١٣٥ ، ٢، ٢١٥ ملليم كافئ من كلوريد الصوديوم التى وصلت نسبة الموت في يرقات الأييدس كاسـبيس الـى ٩٨ ، ٦، ٨٠ ، ٦، ٤٣% علـى التوالـي بعـد سـبعة أيام من المعاملة بالأنتوبكتيريـن. علـى العكـس كـان للملوحة تأثير قليل على حساسية اليرقات الأييدس فلافيسـنس (ساوبينوفار ، ١٩٧٣). لقد وجد الباحث بالارمان وآخرون (١٩٨٣ - b) أن الباسـيلليس الأسـرائيلية ظـل نشـاطها ثابت تحت مدى عريض من الملوحة ضد أنواع الكيولـيكس والأنوفيليس. ١% ملوحة لم تغير من خصائص العلاقة بين الجرعة والموت للأيـيدس والكيولـيكس عـندما تعرضت للباسيلليس الإسرائيلية (Rasnitsyn وآخرون ، ١٩٩٣).

جـودة المـاء معبرا عنها بالملوثات والجسيمات العضوية وغير العضوية قد تؤثر علـى السمية. يبدو أنه توجد علاقة بين التلوث العضوي والجرعة المطلوبة لقتل البعوض مـع الباسـيلليس اسرائيلينسـيز بسـبب مـادة خارجـية تـؤدى الى تناول Bt جاليرى (أنتوباكتيرين) ، Bt ثورنيجيسنيز (باكتوسبين) و Bt كورستاكى (ديبيل) وجدت غير سامة علـى يـرقات Chrysoperia carnea ولكنها كانت عالية السمية على الحشرات الكاملة حيث أحدثت ٧٥% موت. البيض لا يعتبر حساس بشكل مباشر للباسيلليس ولو أن اليرقات الـتى تفقس من البيض لحشرة دودة اللوز الأمريكية المعامل بالباسيلليس كورستاكى حدث لهـا موت عالي عن المقارنة (علي وواطون ، ١٩٨٢ – أ) . بيض حشرة B. selenaria المعامل بالباسيلليس كورستاكى يحدث فيه فقس لليرقات ولكن لا يستمر في المعيشة سوى ٢،٢% (Izhar وأخـرون ، ١٩٧٩). الـيرقات حديثة الفقس لبعض أنواع الحشرات تأكل غلاف البيض بعد الفقس مما يفسر حدوث هذا الموت.

الكائنات الأخرى: Other Organisms

فـــى الماء تقوم الكائنات التى تعيش فيها بتقليل عدد جراثيم Bt والبللورات المتاحة ومـــن ثـــم تقـــل الفعالية ضد الحشرات المستهدفة. مثال ذلك أن التنافس فى تناول الغذاء بواســـطة مرشـــح الغذاء دافنيا كيرفيروستريس أدى الى خفض موت يرقات البعوض بعد المعاملـــة بالباســـيلليس ثورنيجنسيز (بيكروآخرون، ١٩٩٢). فى بعض الحالات لا تعمل الحشـــرات الحساســـة كـــناقلات للعدوى بالبكتريا Bt كما في النقل على واضعات البيض لأشـــباه الطفيلـــيات أو الانتشـــار بواسطة المتر ممات التي تأكل الجيف،. بينما تعمل هذه الكائنات على نشر جراثيم Bt الإ أنه يستحب أن تكون على مستوى عدوى منخفض. نظرا لـــدور البكـــتريا Bt. كبكـــتريا تحـــدث العـــدوى طبيعـــيا أو صناعيا فأنها قد تتداخل مع المـــيكروبيات الأخرى. فى بعض الحالات خارج الكائنات الحية وجد أن Bt لها خصائص مضـــادة للبكتريا. لقد أشار قافريت ويوستن (١٩٨٩) أن سلالة Bt ثورنيجيسنيز أظهرت نشـــاط مضـــاد للبكـــتريا ضـــد ٤٨ من بين ٦٥ سلالة من Bt وكذلك ضد بعض الأنواع الأخـــرى الموجـــبة لجـــرام وليست مع الأنواع السالبة لجرام فى تجربة حقلية أجريت فى السويد تم نشر سلالة Bt أسرئيلينسيز المقاومة لأستربتومايسين فى المستنقع وتم استكشاف التأثـــيرات على بكتريا أخرى. لقد حدث زيادة طفيفة وانتقالية للبكتريا الشبيهة بالباسيلليس اســـتقرت السلالة المتحررة على أعداد قليلة وخارج منطقة الانفراد. بعد سبعة أسابيع من الانفـــراد لـــم يـــتم الكشـــف عـــن تأثـــيرات باقـــية علـــى المجمـــوع الكلـــى للبكـــتريا (Eskils and Lovgren، ١٩٩٧). أظهـــرت الـــتجارب المعملية أن السلالة التى نشرت تـــنمو فى تربة غير معقمة أو معقمة وكان هذا النمو بطيئا وانتقالي وسطى فى التربة غير المعقمة. بعض ميكروبات التربة تضاد Bt بدرجة تتوقف على المحصول ولكن فى دراسة واحدة ثبت أن البكتريا كانت أكثر المجاميع المضادة.

البكتريوفاج Bacteriophage:

البكـــتريوفاج عـــبارة عن فيروسات تهاجم البكتريا ومن ثم تقلل من فاعلية وكفاءة المواد التى تكافح البكتريا. لقد أظهرت عدد من الدراسات أن البكتريوفاج يتحصل عليه من ســـلالات الباســـيلليس Bt (Bal-man وآخـــرون ١٩٨٨ ، كـــندا وايزاوا ١٩٨٩ ، Inal وآخـــرون، ١٩٩٢ ...). البكتريوفاج التى تثبط الباسيلليس اسرائيلينسيز وجدت فى ٩ من بيـــن ١٢ موقع معيشة استكشفت فى مصر (Ali وآخرون، ١٩٩٣). لقد نشر عن عدوى بالبكـــتريوفاج خلال عمليات التخمر لأنتاج Bt (Wu وآخرون ، ١٩٩٨). فى أمريكا وجد

أن العـــدوى فـــى Bt جاليرى تقلل من النمو فى التخمر الصناعي ولذلك يصبح ضروريا اســتبدالها بتحـت أنــواع أخــري مــن Bt لاستكمال الإنتاج (بيرجز H.D). لقد حسن Azizbekyan واخرون (١٩٩٦) سلالات Bt من النوع الملتهم باستخدام ١٢ سلالة أكولة ممــا أدى الـــى الحصول على ٣٧ نوع أو طرز ملتهم من بين ٤٥ صنف سيرولوجى ثم اختـــبارها. لقد أظهر هذا العمل وما سبقه أن تقييم سلالات Bt تبعا للحساسية للبكتريوفاج المختلفة تتمشى مع التقييم المقبول عن الطرز السيرولوجية.

لقــد ذكـــرت قليل من التقارير عن تأثير البكتريوفاج على أداء Bt فى الحقول. لقد أشار Skvortsova وآخرون، (١٩٧٦) أن التلوث بالأنتوبكتيرين مع الفاج تنقص الفعالية البيولوجـــية له بمقدار ٥٥، ٣٣% عن النشاط العادى. لقد ذكر حسين وآخرون (١٩٩٠-١٩٩١) أن بعـــض الفـــاج للباسيلليس أسرائيلينسيز تقلل من الفاعلية ضد الكيوليكس بيبيز إضـــافة علـــى ذلـــك فـــأن الفاج للباسيلليس سيريس و .B سفيركس تستطيع مهاجمة Bt الإسرائيلية مع تأثير تثبيطى على النشاط الأبادى على الحشرات (حسين وآخرون، ١٩٩١) وكـــان الفـــاج الموجـــود فـــى Bt إيزاوايا قادر على تكوين ليسوجين ثابت مع الباسيلليس سيريس (رينولدز وآخرون، ١٩٨٨). الفاج ليس له تأثير مباشر على الفاعلية بعد التطبيق حيث أن السمية Bt تعتمد على بلورات البروتين وليس على الخلية البكتيرية.

ثانيا: نقل ونشر الممرضات الحشرية Transmission and Dispersal :

الـــنقل والنشـــر مـــن العوامل المحددة لنجاح الممرضات الحشرية. النقل من حشرة لحشـــرة أخـــرى ضـــعيف فى العادة وقد لا يوجد مع الباسيلليس Bt كما أن نجاحه كمبيد حـــيوي لا يعـــتمد على معاودة العدوى للحشرات. تدوير الباسيلليس فى مجموع الحشرات المستهدفة غير متوقع الحدوث بعد التطبيق التجاري حيث أن Bt تعمل كتوكسين أكثر من عملهـــا كممـــرض معـــدي فـــى معظم الحالات. عوامل النقل والانتشار التي تؤثر على إيكولوجية البكتريا تشمل المطر والافتراس ووجود المفترسات وأشباه الطفيليات والكائنات غـــير الحساســـة بما فيها الطيور والثدييات الصغيرة. الرياح تستطيع محل الباسيلليس Bt حـــتى ٣ كـــيلو متر من موقع المعاملة. إن قلة البقاء والقابلية المحدودة لدوام العدوى فى مجموع الحشرات تحدد من التوزيع المؤقت والمكاني للباسيلليس Bt. مع ضعف النقل بين الحشـــرات الحساســـة فأن النشر المحتوم يؤدى إلى خفض فى كثافة العدوى مما يفسر عن قليل من السمية فى اتجاه التيار.

النقل الأفقي Horizontal transmission:

بوجـه عـام لا تعتبر بكتريا Bt ممرض معدي شديد ضد الحشرات ولا يحدث لها تجـرثم بشكل دائم فى الحشرات قبل أو بعد الموت. هذا يقلل من تدوير البكتريا والتى تقلل بدورها المخاطر البيئية من الباسيلليس Bt حيث أنها غير ثابتة فى معظم مجاميع الحشرات بعـد التطبيق. لذلك فأن النقل الأفقي يكون محدود مقارنة بمعظم الممرضات الحشرية. لقد قام الباحثان Takatsuka and kunimi (١٩٩٨) بدراسة نقل الباسيلليس أيزاوايا بواسطة يـرقات العمر الخامس للأفستيا كوهينيلا. لم يسجل النقل بعد العدوى فى اليرقات وإدخال الـيرقات المعديـة والصـحية فى عبوات فى نسب متفاوتة. هذا على عكس مايحدث مع epizootics فى حشرة البلوديا التى تسببت بواسطة إدخال ١٠^٤ جراثيم فى أجزاء اليرقة الميـتة (بـيرجز وهرسـت ، ١٩٧٧). الاختلاف قد ينتج من الملاحظة بأن فى المنتجات المخزنة لا تستطيع حرشفيات الأجنحة افتراس اليرقات الحية ولكنها تقوم بأكل الجثث. لقد أعتـبر بـيرجز وهرست، (١٩٩٧) أن افتراس الجثث المعدية كان الوسيلة الأكثر فاعلية للنشر الطبيعى للباسيلليس Bt فى دراسات على البلوديا والأفستيا والجاليريا.

العديـد مـن الحشرات التى تقتل بواسطة إستخدام الباسيلليس Bt لاتعضد التجرثم. الفشل فى التجرثم يتسبب من جراء الجفاف السريع لليرقات حديثة الفقس والجثث الصغيرة أو بسـبب الـنمو الـزائد للنمو الخضري الهوائي للباسيلليس وتطوره فى تجويف الجسم بواسـطة التـنافس مـع كائنات المعدة والتي تتحقق من خلال الحدوث السريع للظروف اللاهوائية عندما يتوقف تنفس الحشرات عند الموت. هناك العديد من التقارير عن التجرثم فـى الجثث. درجات الحرارة العالية (٣٤°م بالمقارنة ١٠-١٩ °م) تحفز وتناسب التجرثم فـى جثث حرشفية الأجنحة (كاتاجيرى وشيمادرز، ١٩٧٤). وقد اتضح أن الظروف التى تناسـب التجرثم لا تحدث دائما. فى حشرة البلوديا وغيرها من حشرات حرشفية الأجنحة فى المواد المخزونة تكون العدوى الطبيعية لمادة خفيفة وتحدث أساسا فى الهيئات المحمية مـثل الغذاء المخزون. لقد لوحظت حالات وفاة عالية بشكل عرضى وكان التجرثم عادى الحدوث فى هذه الحشرات (Burges and Hurst ، ١٩٧٧).

الانتشار Dispersal :

انتشـار الباسيبلليس Bt يرتبط بالرياح والمطر وافتراس الحشرات المعدية المصابة والانـتقال بواسطة الكائنات غير العوائل والحشرات المعدية المتحركة قبل الموت والطيور والثدييـات. المطـر قـد يكون واحد من أكثر العوامل أهمية (Akiba ، ١٩٩١). تساقط

المطر يحرك جراثيم Bt من أوراق الكرنب إلى سطح التربة (بيدرسين وآخرون، ١٩٩٥) وهو من أكثر العوامل شيوعا التى تؤثر على الثبات على المجموع الخضري للنباتات. الباسيلليس يمكن أن تستحرك لأسفل فى بروفيل التربة بواسطة الرى أو المطر. بعد الاستخدام التجاري فأن جراثيم الباسيلليس Bt تحمل بواسطة انجراف الرش وتيارات الهواء. لقد أشارت أحد الدراسات أن تيارات الرياح على طول الوادي تحمل Bt لأكثر من ١٥ كيلو متر من نقطة التطبيق كما تسمح الرياح بالمرور فوق الحواف حتى ٣٠٠ متر أعلى من النقطة التى استخدمت عندها (جريسون وآخرون ، ١٩٧٦). كما نوقش قبلا فقد قام Whaley (١٩٩٨) وآخرون بدراسة انجراف الباسيلليس كورستاكى بعد المعاملة فى يوتا وقد وجد أن حدوث موت للحشرات يرتبط بالباسيلليس على بعد ٣٠٠٠ متر من نقطة المعاملة. لقد سجل نقل الباسيلليس بواسطة المفترسات وأشباه الطفيليات للحشرات المعدية أو على الحشرات غير الحساسة. لقد أشارت عينات الاستكشاف إلى انتشار الباسيلليس كورستاكى عن طريق الخنافس (حتى ١٣٥ متر) وغيرها من الحشرات النشيطة على سطح التربة (بيدرسين وآخرين ، ١٩٩٥). تغذية Bt بواسطة النمل المفترس (فورميكابوليكتينا) وبعدها يسمح للنمل بمص يرقات كريزوميلا بوببليا أدى الى موت ٨٠-١٠٠% بينما عدم التغذية على Bt والعض أدى الى موت ٧، ٦ – ٧، ١٦% فقط. لقد وجد أن نسبة عالية من الجثث الناتجة من التغذية على Bt والعض للضحايا أحتوت على Bt حية وحيوية مما يوضح القابلية للتدوير من هذا الدخول المباشر لهيموسيل الحشرة (أوريكوف وآخرون، ١٩٧٨). من الممكن رؤية هذا التأثير مع معظم البكتريا الملوثة سواء كانت ممرضة للحشرات أم لا.

أوضحت الدراسة التى أجراها شينج وآخرون، (١٩٨٣) نقل الباسيلليس جاليرى بواسطة الأكاروسات المفترسة للحشرات القشرية فى أشجار الصنوبر من كلية تانجنج فى الصين. رش الباسيلليس على الأشجار المزروعة على مسافات متساوية فى مكان به مفترسات يسبب النشر السريع جدا للبكتريا ومن ثم يقلل من مجموع الحشرات القشرية. فى دراسات معملية قام تميرك (١٩٨٢). بتلويث آلة وضع البيض فى أناث البراكون بريفيكورنيس بالباسيلليس قبل التطفل على دودة القصب الكبرى التى تصيب الذرة. لقد وجد حدوث أنتشار سهل للبكتريا Bt الى الحشرات السليمة من ديدان القصب الكبرى فى طور اليرقات من خلال وضع البيض كما وجد أن العوائل تحركت بسرعة أكثر بواسطة الطفيليات الملوثة عما هو الحال مع غير الملوثة وهذا ربما يكون راجعا للفعل المشترك للبكتريا وسم (فينوم) الطفيل. لقد وجد كوستاك (١٩٦٤) كذلك أن اشباه الطفيليات

نيميريـــنس كانسينس المعرضة للباسيلليس ثورينجينسيز تستطيع نقل Bt الى فراشة ايفسيتا كوهينيللا.

لقد أوضح استخدام الباسيلليس كورستاكي ضد آفات الحبوب المخزونة أن الحشرات غـــير الحساســة رايزوبيرثا ، ترابوليوم ، سيتوفيللس قامت بنقل الجراثيم الحية من القمح المعـــامل الـــى غير المعامل بحملها خارجيا أو إخراجها مع المواد الإخراجية الخاصة بها (Mc-Gaughcy وآخـــرون، ١٩٧٥). لاحـــظ Baur وآخرون (١٩٩٨-أ) فى دراسات حقلـــية أن النمل الأرجنتيني الذى يترمم على جثث الحشرات الميتة بواسطة الباسيلليس قد يســـاهم لحــد كبير فى نشر الباسيلليس كورستاكى (ديبيل) الذي يعدى ديدان الكرنب بشكل شـــائع وكذلـــك تغذيـــة الـــزرزور تـــؤدى الى إخراج براز الطائر سامة لديدان الحرير (Fushimi وآخرون، ١٩٩٥)، فى الماء يعتمد نشر الباسيلليس على حركة الماء وترسيب جراثـــيم وبلورات Bt لقد أجريت دراسة عن التوزيع المكاني والمؤقت لجراثيم الباسيلليس كورســـتاكى فى أربعة مجارى مائية بعد الرش الجوى بمستحضر الثوروسيد لمكافحة دودة بـــراعم الصـــنوبر فى كويبيك. فى هذه الدراسة حدث نشر للجراثيم بسرعة وتجانس على طول المجارى المائية (Dostie وآخرون ، ١٩٩٨). على العكس أشار undeen وآخرون (١٩٨١) أن الحـــركة مع التيار للباسيلليس الأسرائيلية كانت ضعيفه فى الغالب. فى ولاية تينســـى وجـــد أن اســـتخدام الباسيلليس Bt أسرائيلينسيز مع تيار الماء الجارى أظهر عدم الكشـــف عـــن البكـــتريا فى الدوامات بالقرب من نقطة المعاملة بعد ٣٤ ، ٤٨ ساعة من المعاملة (فرون وآخرون ، ١٩٨١ – b).

فاعلـــية نشر Bt فى مجاميع الحشرات تعتمد على ميكانيكية النشر. العدوى بواسطة التـــناول عـــن طريق الفم Oral ضعيفة عندما يكون توزيع الجراثيم والبللورات بالعوامل الطبيعية مثل المطر والرياح وفى التربة لأن التركيزات يحدث لها تخفيف مستمر لأقل من مستويات الجرعة التى تحدث العدوى. هذا بينما تكون العدوى كبيرة عندما تسمح الظروف بـــزيادة تركيز البكتريا كما يحدث فى حالات الرشح – التغذية والعدوى فى البراز لأكلات الحشـــرات والجثث المعدية. حدوث الجروح بواسطة عض المفترسات ووضع البيض فى أشـــباه الطفيليات تنشر الباسيلليس بكفاءة لأنها تمر من خلال الحواجز الموجودة فى جدار المعدة وتوصل البكتريا مباشرة الى أنسجة الجسم المناسبة للعدوى. عن هذا الطريق تكون الجـــرعات المحدثـــة للعدوى صغيرة جدا. نشر عدوى Bt يعرف فقط من خلال التجارب التى تستهدف تسجيل موت الحشرات عن طريق ملاحظة الجراثيم سواء بالعين المجردة أو بأطباق الاختبار البكتيري ولكنها لا تؤكد على وجود الباسيلليس بمستويات معدية.

ثالثا: دور وفاعلية خلط الباسيلليس مع المبيدات الحشرية الأخرى:

المبـيدات الحشـرية المحـتوية علـى الباسيلليس Bt تستخدم أحيانا فى خلائط مع المبـيدات والوسائل التى تستخدم فى إبادة الحشرات مثل الممرضات أو الكيميائيات أو فى المواقـف التى يستحب وجود نشاط وفاعلية باقية للمواد التى سبق إستخدامها. لذلك أصبح من الأهمية فهم التداخلات المؤثرة عند التوصية بالاعتماد على Bt كمبيد حيوي ذات أمان بيئي. تحديد وقياس أو الكشف عن تأثيرات الخلط ليس من الأمر السهل بسبب ندرة حدوث اسـتجابات تنشـيطية وغالـبا ما يصطدم التنشيط بالتأثيرات الإضافية حتى على مستوى المعمـل. لقد تناولت القليل من الدراسات إلقاء الضوء عن تأثيرات استخدام الباسيلليس Bt مـع المبيدات أو الممرضات ضد الحشرات غير المستهدفة. هذا أدى الى الحاجة باستقراء مـا يحـدث مع دراسات التأثيرات على أنواع الآفات. فى الغالب تتفاوت الاستجابات مع الجـرعة حيث قد نجد تأثير تنشيطي أو إضافي مع جرعة واحدة بينما قد تكون الاستجابة تضـادية مـع جرعة مختلفة. بوجه عام وجد أن المبيدات الكيميائية حفزت أو زادت من فاعلية الباسيلليس Bt ولو أن هناك بعض الأستثناءات. تداخلات الباسيلليس مع الممرضات تـتفاوت ومـن النادر أن تكون تنشيطية حيث أن Bt تتنافس مع الممرضات الأخرى فى الحصول على المواد الطبيعية التى تقدمها العوائل الحشرية.

التداخلات مع الممرضات Interactions with pathogens

المـيكروبات المرضـية علـى الحشـرات (مـثل النيماتودا الممرضة للحشرات entomopathogenic) تحـدث طبيعـيا فـى مجمـوع الحشرات وقد تستخدم كوسائل للمكافحـة الحيوية. حيث أن الممرضات تحدث في كلا مجاميع الحشرات أو مجاميع خالية من الآفات فأن تداخلاتها مع الباسيلليس Bt هامة فى تقديم التأثير البيئي للباسيلليس. بسبب أن الممرضات تتنافس مع Bt على العوائل فانه من المتوقع أن التأثيرات قد تكون أقل من الإضـافية أو حـتى تضـادية antagonistic. لقد تم تدوين ما تحصلت عليه من تقارير اسـتخدام النـيماتودا والبروتوزوا والفيروسات والفطريات مع استخدامات الباسيلليس فى جـدول (٣-٤). بوجـه عام فأن التداخلات تمثل ناحية التضاد البسيط بينما أشارت بعض التقارير القليلة الى تداخلات أكثر إيجابية بما فيها التنشيط الممكن والمحتمل.

النـيماتودا المرضـية للحشرات من أنواع Heterorhabditis و Steinernema استخدمت مع البيتا – أكسوتوكسين باسيلليس كورستاكى ، ايزاويا ، ثورينجنيسيز . عندما اسـتخدمت ضـد الجعال فى التربة أظهرت النتائج تأثيرات إضافية أو أفضل (كوبنهوفر

وكايـا، ١٩٩٧) بينما كانت التأثيرات على حشرات حرشفية الأجنحة سالبة (جدول ٣-٤) بسبب التأثير المقارن الكبير للباسيلليس على يرقات حرشفية الأجنحة في منطقة الفيللوسفير حجبـت التأثـير القليل نسبيا للنيماتودا فى مكان المعيشة هذا. أظهر أحد الاختبارات على أنـواع حشـرات ذات الجناحيـن (تيبولا بالودوسا) والبيتا – أكسوتوكسين حدوث تداخل تنشـيطي (لام دوبيسـتر، ١٩٧٢). إستخدام الباسيلليس Bt والنيماتودا المرضية للحشرات S.Feltiae أظهـر تداخـل تضادى فى مكافحة الدودة القارضة حيث أن الجثث لم تعضد تكاثر النيماتودا.

حشـرات حرشـفية الأجـنحة غالـبا تعانى من فيروسات البولهيدروزيس النووية (NPV's) وقـد استخدمت هذه الفيروسات كوسائل مكافحة حيوية لسنوات عديدة. التقارير الخاصـة باسـتخدام الباسـيلليس كورستاكى مع فيروس NPV's ضد حشرات حرشفية الأجـنحة متضاربة حتى مع نفس العائل. مثال ذلك ما وجده Luttrell وآخرون (١٩٨٢) مـن أن تأثـير الفيروس NPV مع الباسيلليس كورستاكى على دودة اللوز الأمريكية التى تتغذى على القطن كانت أقل من إضافية بينما وجد الباحثان بيل ورومين (١٩٨٠) أن تأثير كورسـتاكى NPV/Bt علـى نفـس العائل على القطن كانت إضافية. عدم التوافق بين NPV والباسـيلليس Bt سـجل مـع العديد من حشرات حرشفية الأجنحة وقد ترجع الى إيقاف التغذية المتسبب عن الباسيلليس والتى تمنع تناول الفيروس (Navon، ١٩٩٣). فى بعـض الأحـيان يكون تأثير الفيروس NPV ضد حشرات حرشفية الأجنحة إضافي كما حدث عندما أستخدم مخلوط الباسيلليس والفيروس (AC NPV) ضد دودة اللوز الأمريكية (بـيل وروميـن، ١٩٨٠). الكميات غير القاتلة من الباسيلليس كورستاكى (نصف المعدل الحقلـي للديبيل قابل للبلل) مع أقل جرعة من الفيروس NPV (٣×١٠^{١١} أجسام البولى هـيدرال (PIB) / هكـتار بالمقارنـة بأعلى جرعة ١ر٥ $\times ١٠^{١٢}$ PIB /هكتار) كانت أفضـل ممـا هـو الحـال مـع استخدام المادة أو الوسيلة منفردة فى مكافحة آفة الكرنب تـرايكوبلوزيا فى (تومبكنيز وآخرون ، ١٩٨٦) وهذا قد يرجع لأن الجرعات غير القاتلة لا تقلـل من التغذية (نافون، ١٩٩٣). لقد كان تأثير البولهيدروسيز فيروس السيتوبلازى (CPV) والباسـيلليس ضد حشرة الصنوبر D. spectabilis إضافيا أو عاليا بعد التطبيق الميدانـي. عـندما أسـتخدم الباسـيلليس Bt (ثوروسـيد أو ديبيل) مع الفيروس الحبيبى granulosis لحشرة Z. diniana حدث تأثير مضاد للفيروس (Schmid، ١٩٧٥). على عكـس هـذه النتيجة لوحظ تأثير تنشيطي عندما استعملت الباسيلليس على اليرقات المعدية فعـلا بالفيروس مما يوضح أن مدى الاستجابة الممكنة يعتمد على ظروف التجريب ووقت

المعاملة ... الخ تنشيط الفيروسات الحشرية المتأخرة يمكن من خلال معاملات الباسيلليس. لقد أشار Manshev ، (١٩٨٠) زيادة نسبة موت يرقات الحرير بواسطة الفيروس بمقدار ٦، ١٣% بعد المعاملة بالجرعات غير المميتة من الديبيل حيث أن يرقات دودة الحرير غير المعاملة سجلت موت بواسطة الإصابة الفيروسية مقداره ٧، ١%.

من أكثر أنواع الفطريات الممرضة للحشرات الشائعة الاستخدام البوفاريا باسيانا، Metarhizium.anisopliae. لقد أعطت هذه الأنواع الفطرية نتائج متفاوته مع الباسيلليس كورستاكى عند الخلط. خلط البوفاريا مع Bt أظهرت تأثير تضادى مع دودة ورق القطن فى المعمل بينما كان الفعل استقلالي independent (إضافي ؟) على ثاقبة الذرة أوسترينيا نوبيلاليس (لويس وبنج، ١٩٩١). لقد استخدمت التوكسينات من النوع الفطري M.anisopliae فقط مخلوط مع الباسيلليس كورستاكى وكانت التوكسينات منشطة مع الجرعات الواطية (Brouseau وآخرون، ١٩٩٨). الممرضات البروتوزوية الميكروسبوريدية مثل النوزيما بيروستا، الفيريمورفا نيكتريكس أظهرت تداخلات مابين التضاد وحتى التنشيط مع الباسيلليس ضد حشرات حرشفية الأجنحة (جدول٣ –٤). العدوى ببكتريا Bt قللت من كفاءة العدوى بالبروتوزوا الممرضة للحشرات "النوزيما" ضد حشرة حرشفية الأجنحة L.albicosta عن طريق جعل الخلايا الطلائية تحجم وتخفى جراثيم الميكروسبوريديا والخلايا الخضرية فى جدار المعدة (هللميز وودبرج، ١٩٧٦).

التداخلات مع المبيدات الكيميائية Interaction with pesticides

استخدام خلط المبيدات الكيميائية والباسيلليس Bt أدى الى حدوث زيادة معنوية مؤكدة فى الفاعلية ضد الآفات المستهدفة وكانت معظم الأستجابات تتراوح من التأثير الإضافي أو التنشيطي (جدول ٣–٥). لقد أستعرض Benz ، (١٩٧١) الدراسات الخاصة بالتداخلات بين الكائنات الدقيقة والمبيدات الحشرية الكيميائية. فى السبعينات أشارت العديد من الدراسات أن الجرعات غير المميتة من المبيدات الحشرية ذات تأثير إضافي أو تنشيطي مع الباسيلليس (Morris، ١٩٧٢). هذا ولو أن التقارير عن تأثيرات الخلط فى المراجع تشير الى نتائج متفاوته ومختلفة. مثال ذلك أن تأثير منظم النمو الحشري "مانع الانسلاخ" المسمى دايفلوبنزيرون مع الباسيلليس تراوح من تضادي عندما أستخدم ضد دودة اللوز الأمريكية (محمد وآخرون ، ١٩٨٣) وحتى التنشيط ضد دودة ورق القطن (زاد وتريشنايا ، ١٩٩٦). فى الاتحاد السوفيتى السابق استخدمت مخاليط من مستحضرات الباسيلليس مثل Gomelin أو دندروباسيللير مع الديميلين ضد يرقات حشرات مختلفة وقد

تحصل على نسبة موت ١٠٠% فى اليرقات الصغيرة مع الجرعات الواطية عما هو الحال عــندما استخدمت منفردة (Grigoryan وآخرون ، ١٩٨٨) البيرثرمودز عادة ذات تأثير تنشــيطي أمــا مانعات الانسلاخ أو الكيتنيزس تحدث عدم تأثير أو حتى تنشيط ضد أنواع الحشــرات المختلفة. أظهرت القليل من الدراسات أن استخدام مخاليط ضد الحشرات غير حرشــفية الأجــنحة تعطــى تأثيرات تتراوح من إضافي الى تنشيطي وهذا واقع من خلط المبــيدات مــع الباســيلليس أسرائيلينســيز فى الماء. لقد تحصل على نفس التأثيرات مع الباسيلليس كورستاكى والثورينجينسيز ضد حشرات tenebrionidae .

لقــد أظهــرت العديــد من الدراسات الحقلية أن استخدام خلائط المبيدات الكيميائية والباســيلليس أدت الــى حدوث تأثيرات عالية على المفترسات غير المستهدفة والطفيليات عمــا هو الحال مع إستخدام Bt منفردة (كينيدى وأوتمان، ١٩٧٦، موريس وأرمسترونج، ١٩٧٥). بينما لم تكن هذه النتائج متوقفة فأن هناك حاجه إلى دراسات مستقبلية.

الباب الرابع

المبيد الحيوي باسيلليس تورينجينسيز واستخداماته في الدول النامية

مقدمـــة : لســت في حاجة للقول بأنه في العديد من دول العالم تعتمد وقاية النباتات بشكل أساســي و كثيف على المبيدات. بالرغم من أن هذه المبيدات تحقق فاعلية جيدة في مكافحة الآفــات إلا إنها سببت ومازالت تسبب العديد من المشاكل الخطيرة : إضرار صحية على الإنســان و الحيوان، تحطيم وسائل المكافحة الطبيعية، زيادة مقاومة الأنواع الرئيسية من الآفــات الحشرية و ما يستدعي ذلك من زيادة تدريجية في الجرعات المطلوبة لمكافحتها. علـــى الـــرغم من تضاعف كميات المبيدات الحشرية عشرة مرات منذ الاربعينيات الا ان الفقــد المحصـــولى تضـــاعف ايضـــا مرتان خلال نفس الفترة. لقد ادي ذلك الى المناداة بضـــرورة ايجاد طرق ووسائل اخري لمكافحة الافات جنبا الى جنب مع المبيدات و ليست بديـــلا لها و قد كان الصوت الغالب يتمثل في تعظيم مجهودات الحصول على المبيدات أو التجهـــيزات الميكروبـــية. لقد تاكد ان الوسيلة الميكروبية التى تحقق الاهداف المرجوة هي بكتريا الباسيلليس تورينجنسيز أو المايسترو الرائد كما اثرت ان اسميها كعنوان لهذا الكتاب و الـــتى تختصر الى BT. لقد اثبت هذا الكائن الحي الدقيق انه سلاح فعال وفتاك وناجح فـــي مجابهـــة بعض الافات الزراعية و بعض ناقلات الامراض. مع هذا فان استخداماته مازالـــت محدودة في الدول النامية باستثناء الصين التى تنتجه بشكل واسع وتستخدمه على نطـــاق كبـــير ايضـــا. البكتريا هذه ليست سامة للانسان و معظم الحشرات الاخري غير المستهدفة و البيئة بشمول اكبر. هذه البكتريا تستهدف افات معينة. امان هذه البكتريا يرتبط بانخفـــاض تكالـــيف الحصـــول علـــيها وتطويرها وكذلك صغر تكاليف التسجيل مقارنة بالمبيدات التقليدية. من حسن الطالع انه قد عقدت ورشة عمل دولية عن بكتريا الباسيلليس تورينجيســـيز BT واســـتخداماتها في الدول النامية في الفترة من ٤-٦ نوفمبر ١٩٩١ في المركـــز القومـــي للبحوث في مصر و صدر كتيب الورشة عام ١٩٩٣. لقد عقد المؤتمر بالـــتعاون و المشاركة بين المركز القومي للبحوث في مصر و المركز القومي لتطوير الـــبحوث IDRC فـــي اوتـــاوا ووزارة الزراعة الكندية – وينيبج – مانيتوبا. لقد تمثلت اهداف ورشة العمل في النقاط التالية:

١- تعريف التحديات التى تجابه استخدام بكتريا BT في الدول النامية.

٢- مناقشة احدث الدراسات و البحوث التى ترتبط بالدول النامية.

٣- تعريف الحاجة و اولويات زيادة استخدام بكتريا BT في الدول النامية.

١ـ تطويــر عزلات باسيلليس تورينجينسيز والميكروبات الهوائية المشابهة للاستخدام في الدول النامية.

من مقالة للدكتور H.T. Dulmage في Brownsville – تكساس انذاك لقد حدث تطــور كبــير فــي الحصول على عزلات افضل من باسيلليس تورينجنسيز (B.T.) في مكافحـــة حشــرات الترايكوبلوزياتــي ودودة اللوز الامريكية. لقد وجد ان المستحضرات الابتدائــية مــن HD-1 كانــت اكثر فاعلية بمقدار ١٠٠ مرة عن المنتجات التجارية التى كانــت موجــودة في ذلك الوقت. منذ ذلك التاريخ زاد انتاج توكسينات الباسيلليس بمقدار ١٠٠ ضــعف فــي حضانات التخمر. لسوء الحظ عكست الزيادة الكبيرة في الانتاج مدي ضــعف المستحضــرات الاصلية. حتي مع هذه الزيادة فان المستحضرات الجديدة لم تكن فعالة أو اقتصادية بما يكفي للاستخدام الواسع في مكافحة الافات الحشرية في الغابات. لقد ادي التعقــيد من جانب كيميائي المستحضرات ومهندس التطبيق الى تحقيق الحصول على منــتجات وطرق تطبيق جعلت من السم الداخلي المسمي HD-1 endotoxin فعال بشكل اقتصــادي فــي مكافحــة افــات الغابات الحشرية. لقد تاكدت امكانية التحسين الكبير في مستحضــرات ممرضــات الحشــرات ولــو ان ذلك يستغرق وقتا ومجهودا كبيرا الا ان التحسين ممكن ومؤكد. هذا من المفاهيم العامة ولكنة ينسي بشكل متكرر وملحوظ. بالرغم من وضوح الرؤية اشار كاتب المقال باننا مازلنا في المراحل المبكرة والاولى من المعرفة حــول هذه الممرضات للحشرات أو توكسيناتها والتى يمكننا تحقيق تحسينات ملحوظة في الفاعلية والانتاج والمستحضرات وطرق التطبيق فان العديد من العلماء يميلون بشكل قوي شانهم شان مسئولى الادارات الذين يدبرون النفقات والميزانيات ويعتقدون بان ما نحن فيه الان يمثل الوضع الافضل في هذا المجال. العديد من تقسيمات الممرضات الحشرية مقيدة باحكــام مبنية على المعرفة الحالية وحتى هذه لا تسمح بامكانية التحسين في السلالات أو الطــرق. لابــد وان هناك عزلات افضل اذا استمرينا في البحث عنها. هناك طرق تخمر وطــرق شــفاء واسترجاع افضل اذا نحن دخلنا في مجال البحث عن نظم افضل للتخمر. هــناك طــرق افضل لاستخدام هذه الممرضات و التوكسينات اذا تمكنا من تحقيق تعاون وثــيق بين رجالات الحشرات والميكربيولوجي والكيمياء والهندسة الصناعية ما يؤدي الى تحقيق الاهداف المرجوة من هذه التكنولوجيا الجديدة.

١- أساســيات التخمر: على امتداد السنوات القليلة الماضية احدث نجاح استخدام عزلات الباســيلليس تورينجينســيز (Bt) في مكافحة العديد من الافات الحشرية الزراعية و تلك

التي تستهدف حتي الحصول على طرق تخمر اكثر كفاءة. لقد ثبت الفاعلية العالية لعزلتين مـن هـذا الجنس ضد الحشرات ذات الاهمية الاقتصادية الكبيرة وهما: B.t. تحت النوع كورسـتاكي الفعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة و Bt تحت النوع اسرائيلينسيز الفعالة ضـد البعوض و الذباب الاسود. لقد حدث تباطيء في هذا التطور بسبب الفهم غير الكامل عـن ماهـية بكتريا B.t وماذا يمكن ان تعمله ومالا يمكن ان تعمله ولماذا ؟ لقد ادي هذا الاعـتقاد لـدي كاتـب هذا المقال انه يمكن القيام بالاسهام في استعراض الاسس الخاصة باساسـيات الـتخمر مـع توضيح امكانية تطباق هذه الاسس على كل انواع التخمر سواء كانـت بكتيرية أو فطرية أو اكتينومايستيس. سوف نتناول ما احدثته عمليات التخمر نحونا فـي الماضي وماذا ننتظر ونتوقع منها في المستقبل مع مناقشة مدي ارتباط انتاج Bt مع دراسات هذا الملتقي.

١ـ١ تـاريخ الـتخمر : في الايام الاولى من بحوث التخمر كانت تعزي اية فاعلية ابادية ضـد الحشرات في التخمر الميكروبي الى التنافس من اجل الغذاء حيث يشير النمو الـبطيء للميكروب الى خسارته المعركة. لسوء الحظ فان العدوي تلعب دورا قليلا أو لا تلعـب دور فـي معظـم الانشطة الميكروبية الابادية والفشل في تحديد هذا المفهـوم يؤخر العديد من الاكتشافات. مثال ذلك ما حدث من قيام العلماء لسنوات عديدة بالاعلان بان الفطر بنسيليوم نوتاتم (ملوث شائع لاطباق الاجار) عندما ينمو فـي مـزرعة مخـتلطة مع البكتريا الموجبة لجرام فانها تقتل البكتريا عن طريق منافسـتها فـي الحصول على الغذاء المتوفر. لقد ثبت ان هذا الاعتقاد خاطيء: لقد كـان البنسـيليوم نوتـاتم فعـالا ونشيطا بسبب انتاجه لسم كيميائي وهو البنسيلين penicillin الفشـل فـي تميـيز الاختلاف بين فاعلية التوكسين (المضاد الحيوي antibiotic) أو الانتاج الفعال للتوكسين وعدم الفاعلية اخرت استخدام هذه الوسيلة العلاجـية الفعالـة لمدة طالت ٤٠-٥٠ عاما. كنوع من الاهتمام و الاثارة توجهت الجهـود نحو معرفة واثبات فاعلية مثل هذا الفطر والفطريات المشابهة بسبب انتاج المضـاد الحيوي بدرجة تفوق مجرد العدوي مما ادي الى حصول العالم فليمينج و معـاونوه علـي جائـزة نوبـل. بعد وقت قصير من انجاز فليمينج تم الكشف عن المضـاد الحيوي "ستربتومايسين بواسطة الباحث واكسمان. الاستربتومايسين الذي ينـتج بواسـطة ستربتومايسين جريسيوس كان من اول الوسائل التى تعالج بشكل حقيقي السل الرئوي tuberculosis وقد حصل واكسمان على جائزة نوبل عن هذا

الاكتشـــاف. لقــد فــتح هذا الكشف المجال لامكانية انتاج العديد من المواد النشطة حــيويا من عمليات التخمر. منذ ذلك الحين تم اثبات ان مئات الميكروبات المختلفة تنــتج مــدي واسع من المواد الحيوية. لقد تاكد بشكل معنوي ان هذه المواد الناتجة عبارة عن كيميائيات معقدة غالبا لا ترتبط مع بعضها البعض، وقد وجد ان الانواع العديــدة مــن المــيكروبات مــثل الفطريات والبكتريا والاكتينومايستيس تعتبر من المصـــادر للكيميائـــيات الحيوية الفعالة التى تتميز بانها تراكيب جزيئية معقدة مما يجعل تخليقها مكلف للغاية ومن ثم تنتج عادة بتكاليف اقتصادية.

هذه ليست نهاية القصة حيث انه بمجرد التاكد من ان منتجات التخمر ذات انشطة حــيوية مفيدة بدات العديد من المعامل في كل انحاء العالم في فحص تخمير البيرة ومـــا اذا كـــان ينـــتج مركبات اخري وقد كانت النتائج مدهشة. في الوقت الحالي تستخدم الكثير من نواتج التخمر في مكافحة انواع عديدة من الميكروبات المرضية. تفــيد هــذه الــنواتج في تخليق الاستيرويدات وهى تلعب دورا مهما في نظم علاج للسرطان كيميائيا (اكتينومايسين – دي) ربما يكون من الاستخدامات غير المتوقعة اســتغلالها فـــي مــنع رفض الجسم للعضو المزروع (مثل سيكلوسبورين). كذلك تســـتخدم هذه المنتجات في مكافحة العديد من الناقلات الحشرية لمسببات الامراض حول العالم. لقد تاكد ان عزلات عديدة من الباسيلليس تنتج مواد تبيد الحشرات تفيد في مكافحة الحشرات التى تصيب الزراعات المختلفة (H-14, HD-1) .

١-٢ التخمرات المغمورة Submerged Fermentations

اذا تكلمـــنا عـــن الاساسيات لهذه العمليات نقول ان تخمرات Bt تحتاج لمستويات عالية من الكربون والنيتروجين والاكسجين. بداية فان الميكروبات الهوائية مثل B.t. تحـــتاج للهـــواء بشـــكل كبـــير في المراحل الاولى من التخمر في الغالب يكون من المستحيل تشبيع مزارع نمو B.t بالهواء في المرحلة اللوغاريتمية في مخمر سعة ١٤ لـــتر حتـــي مـــع معـــدل تهوية ٢ مجم/ متر . المستويات العالية من الكربوهيدرات المطلوبـــة فـــي تخمـــر بكـــتريا Bt عـــادة تـــزود من الدكستروز والنشا. حيث ان الكربوهـــيدرات تستطيع انتاج كميات كبيرة من الاحماض العضوية والتى تخفض من رقـــم حموضة التخمر الى ٥,٢– ٥,١ و هي الدرجة التى لا نستطيع الباسيلليس النمو فـــيها ومـــن ثـــم تقـــف عملية التخمر. (معادلة هذه الحالة تسمح للميكروب بالنمو). المســـتويات العالـــية من النيتروجين ومن نفايات البروتينات ونواتج التحلل المائي أو

منقوع الذرة) ينشط النمو وفي هذه الحالة يفرد قواعد عضوية. لذلك فان التوازن بين النيتروجيـن والاكسـجين يؤثـر بشكل واضح على درجة الحموضة خلال عمليات الـتخمر. ضـبط الحموضـة في التخمر (من ٥,٤ - ٨,٤) يمكن تحقيقها من خلال الاختـيار الصحيح للمواد المغذية والتوازن الحامضي من الكربوهيدرات والقواعد من البروتيـنات. فـي النهاية فان توازن الاملاح المعدنية مطلوب كذلك. البيئة النموذجية موجودة في جدول (٤-١).

جدول (٤-١) : بيئة التخمر B- 4b

Proflo	20.0 g/liter
Peptone	2.0
Dextrose	15.0
Yeast Extract	2.0
$CaCO_3$	1.0
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.3
$FeSO_4.7H_2O$	0.02
$ZnSO_4\ 7H_2O$	0.02
Distilled H_2O to 1000 ml	

إذا تكلمـنا عـن الاخـتلافات الفلسفية بين طرق التقييم الحيوي للمبيدات الكيميائية والحـيوية نقـول ان علمـاء تقييم كفاءة المبيدات الحشرية دخلوا عالما جديدا مع ظهور المبـيدات الميكروبـية. فـي حالة المبيدات الحشرية الكيميائية يكون القائم بالتحليل على درايـة كافية بكمية ونقاوة المبيد تحت الاختبار. التحليل ليس عملية اضافية لعملية الانتاج ولكنه مطلوب فقط للتاكد من المواصفات . في حالة المواد الميكروبية مثل Bt فان التحليل يجـب ان يستكشف كل مراحل عملية الانتاج مثل: جودة عملية التخمر ، ما هو نوع الفقد الـذي يحـدث للفاعلـية خـلال اسـترجاع المادة الفعالة من وحدة التخمر، جودة المنتج المسـترجع وخصـائص المستحضـر النهائي. كل هذه الاعتبارات والمحدودات يجب ان تعـرف وبدقة وجميعها يمكن التحقق منها عن طريق التقييم الحيوي. التقييم الحيوي ليس هامشـيا أو كمالـيا لهذه العملية الخاصة بالحصول على بكتريا Bt ولكنه عامل محوري. لذلك فان العقلانية والدقة المطلوبة للتقييم الحيوي للمبيدات الحشرية الميكروبية اكثر كثيرا مـن تلك المطلوبة مع المبيدات الكيميائية (DuImage، ١٩٩٠). عمليات الاسترجاع للمبيد الحشـري الكيميائي عادة تجري مع تركيز عالى من المركب بينما اجراء هذه العملية مع

المبــيد الميكروبــي مــثل HD-1 يــبدأ في العادة مع تركيز منخفض (١٠ ميكروجرام مركب/لتر أو اقل) وهي عملية شاقة.

٢ــ الباســيلليس تورينجينسيز : اذا تكلمنا عن الاكتشاف و التقسيم لبكتريا B.t. نقول ان Bt لوحظت في البداية بواسطة الباحث Ishiwata حيث وجدها في مزرعة ديدان الحرير المريضـــة أو الميتة في اليابان عام ١٩٠١. لقد كان الوصف الذي قدمه ايشيوانتا كافيا بما يجعلــنا نمــيز انــه قد قام بعزل .B.t الا ان التسمية لم تكن مناسبة حيث تركت للباحث Berliner عـــام ١٩١١ كي يسمي عزلته Bacillus thuringiensis رجوعا الى ولاية Thuringia الالمانية حيث وجدها. من الواضح ان .B.t تتوزع بشكل عريض في التربة ومــن ثم توجد فيها بشكل متكرر وعلى حد علمي فانه لم يتمكن احد من عزل B.t من أي حشـــرة ضارة فيما عدا مكان المعامل حيث كانت تنمو الباسيلليس في الماضي. لقد حدث تضارب بين العلماء وعدم اتفاق عن عزلات Bt في بداية العمل خاصة فيما يتعلق بتمييز الانــواع المختلفة من Bt التي وجدت في المعامل المختلفة. في عام ١٩٥٨ اثار الباحثان Bonnefoi and Barjac ان افضــل تقسيم العزلات Bt يبني على التفاعلات الانتيجينية للاسواط المرتبطة بالخلايا الصغيرة والنشطة الحركة للباسيلليس.

التســمية تبعا لمقترح بونيفوي وبارجاك مباشرة ولا لبس فيها حيث يمكن من خلال هــذا الــنظام تقسيم العزلات المختلفة الى مجاميع ومع كل مجموعة خصائصها الانتيجينية الممــيزة. بــناء على هذه الخصائص فان المزارع تاخذ اعداد H-number (ايضا يطلق علــيها طرز سيرولوجي أو تحت النوع) والتى توضع في رتبة تتابع أو في مجموعة من عــزلات اخري. لقد وجدت علاقة وارتباط واضح بين انواع H-types و النشاط الابادي ضــد الحشــرات. من الصعوبة رؤية علاقة بين انيتجين السوط للخلية الخضرية من Bt وتوكســين الابادة الذي تنتجه الخلايا عندما تتجرثم واذا وجد الارتباط يكون غير كامل كما سنري فيما بعد. الطرز السيرولوجية نظام بسيط سهل الاستخدام وطريقة الحصول عليها مقبولة لتقسيم عزلات الباسلليس Bt المختلفة. لذلك فان مكتشف أي عزلة جديدة عنده ميزة تسمية اكتشافه. من العزلات الهامة ثلاثة من بين ٣٥ عزلة معروفة نذكرها في هذا المقام:

H-3a,3b	Kurstaki HD-1	(Dulmage, 1967)
H-7	Aizawai	(Aizawai, 1962)
H-14	Israelensis	(Goldberg, 1980)

مناقشـــة دور الجرثومة في تخمرات Bt تشير الى ان الجرثومة عند افضل الحالات تعتـــبر عـــامل ثـــانوي فـــي قتل الحشرات. النشاط الابادي على الحشرات لعزلات B.t. والمستحضـــرات ترتـــبط بالتوكسينات البللورية والبروتينية التى تنتج بواسطة خلايا B.t. وتسمي الدلتا ـ اندوتوكسين. كما هو معلوم فان الجراثيم والبللورات لا تنتج بالتوازي ولا يرتـــبط كلاهمـــا بالاخر أو بالفعل السام. لم يكن ذلك معروفا لسنوات عديدة وكل ما كان يجـــري في البحوث عن Bt من قبل كان يعتمد على عد الجراثيم لتقييم نتائج الدراسة. في الواقع والحقيقة فان الوكالات التشريعية في امريكا تتطلب وتشترط ان تكون المستحضرات الـــتجارية للباسيلليس B.t. قياسية المواصفات عن طريق محتوي وعد الجراثيم كما تشترط ان توضـــح الـــبطاقة توضيحا بان الكفاءة معبر عنها بعدد جراثيم B.t. يكون خلال التقييم الحـــيوي. عد الجراثيم يعطي تقدير جيد وعقلاني لنمو الباسيلليس في المستحضر الاصلي. لســـوء الحـــظ فـــان الاعتماد على عد الجراثيم لقياس كفاءة التجهيز يعتبر منافي للصواب لسببين بعيدا عن عدم الدقة في عد الجراثيم وهما:

أ- لا يوجد سبيل لتجهيز تحت الانواع مع عد الجراثيم.

ب- لا يمكـــن الحصـــول علـــى أي معلومـــة عن عنف العزلة أو ضعفها من خلال عد الجراثـــيم. عـــد الجراثـــيم تعتبر وسيلة مفيدة في تتبع نمو بكتريا Bt في العينات من وحدات التخمر أو التجزئة و الفصل خلال دراسات الاسترجاع. الجدول ٤-٢ ، ٤-٣ توضـــح المشـــاكل التى تنجم مع عدد الجراثيم حيث الجدول (٤-٢) يقارن بين عدد الجراثيم مع الكفاءة في الوحدات الدولية International units (IU) لثمانية عزلات Bt نامـــية فـــي بيئة متماثلة. عدد الجراثيم المقدر مع ٧ من هذه العزلات يختلف في مدي ضيق (٦-٧ x ١٠ ^٦^ جراثيم حية /جم) ولا ترتبط كلاهما مع الاخر. على نفس المنوال فان الكفاءة المقاسة في التقييم الحيوي في مقابل أو ضد دودة اللوز الامريكية تـــتراوح من صفر وحتي ٧٠٦٠٠ وحدة دولية/مللجم مع عدم وجود دليل على ارتباط بيـــن الجراثـــيم واللـــبلورات. العزلتان HD 244, HD263 تنتج مستحضرات اكثر فاعلية عن باقي العزلات. الجدول يشير الى بعض التحيز بوضع و تضمين العزلات HD 563, HD 519 ضـــمن العـــد العـــالى للجراثيم حيث ان كلا المزرعتان طرز ســـيرولوجية H-14 (تحـــت النوع اسرائيلينسيز). عزلات H-14 تنتج توكسبين ذات وزن جزيئـــي مـــنخفض و أنشـــطة سامة مختلفة وسم دلتا- اندوتوكسين متميز ذات

فاعلية قليلة أو بدون فاعلية أو كفاءة عالية ضد البعوض. هناك شك فيما إذا كان H-14 تقسم كنوع جديد.

جدول (٤-٢): التداخل بين عد الجراثيم ونشاط العزلات المختلفة من الباسيلليس تورينجيسيز.

Activity vs.				
Culture No.	Serovar.	Spore count X 10^9/ G	H. virescens (Kiu/G)	KIU /10^9 Spores
HD-2	H-1	12	1.410	· 120
HD-83	H-3A	6	Inactive	0
HD-1	H-3A,3B	17	15.400	910
HD-263	H-3A,3B	11	54.600	4.210
HD-244	H-3A,3B	13	70.600	5.400
HD-305		16	943	59
HD-519		63	Inactive	0
HD-563		62	Inactive	0

ملحوظة: المناقشات المذكورة في هذه المقالة مأخوذة و مشتقة من ورش العمل التي عقدت في الدول المختلفة بداية من عام ١٩٧٧ وحتي السبعينات وسوف اضعها بالانجليزية كما هي

*N.B. The following discussions are derived from a series of workshops conducted in the country and year indicated: New Zealand (1977); Italy (1979; 1980); Japan (1980); USA (1980); Israel (1988); Brazil (1988; 1990). In addition, a series of unpublished workshops were conducted in Egypt (1980); China (1982; 1988); England (1985); and the philippines (1987).

جدول (٤-٣): الارتباط بين عد الجراثيم و الفاعلية لنفس المزرعة النامية في بيئات مختلفة.

Activity vs.				
Culture No.	Medium	Spore count X 10^9/ ML	H. virescens (Kiu/ML)	KIU/10^9 Spores
HD-263	A	1.2	5.800	4.830
	B	1.7	12.100	7.120
	C	2.4	3.830	1.600

اذا تكلمنا عن خصائص بكتريا B.t. نقول ان Bt تماثل B.cereus كائن شائع في التربة في الحجم والشكل والسلوك مع استثناءان ذات اهمية كبيرة في نفس الوقت الذي تتجر ثم فيه خلايا B.t. تظهر في الخلايا الاجسام الجرثومية والتى تكون بللورية الشكل في العادة. هذا من اكبر خصائص هذه المجموعة من البكتريا الباسيلليس والتى يشيع الاشارة اليها بالبكتريا البللورية Crystalliferous.bacteria الاجسام الجرثومية parasporal يشار اليها بشكل غير دقيق أو مرن" بللورات Crystals" او التوكسينات البللورية crystalline toxins والتى نوقشت على انها " دلتا اندو-توكسينات - delta endotoxins" ان وجود أو غياب البللورة لا يستخدم كمعيار مطلق أو منفرد للتعريف والتمييز بين B-cereus, Bt خاصة خلال دراسات التخمر. ان حظر النظر الفاحص الشديد للباسيلليس Bt غير البللوري يجب استبعاده. ولو ان هذا قد لا يكون دقيق دائما فان التقسيم الاولى للمزارع يتوافق مع معايير B.cereus بشكل مباشر ومستقيم. اذا تم الكشف عن وجود الاجسام البللورية يطلق على الباسيلليس B.t. واذا لم توجد يطلق على البكتريا B-cereus .

العديد ان لم يكن الجميع للبلورات الناتجة بواسطة بكتريا Bt سامة لواحد أو اكثر من الانواع الحشرية. مرة واحدة ساد الاعتقاد ان كل هذه التوكسينات البللورية فعالة ضد الحشرات وحديثا اتضح ان عزلات عديدة تماثل Bt في احتوائها على بلورات ولكنها بدون اية تاثيرات ابادية على الحشرات. هذه التوكسينات البللورية كمجموعة تسمي "دلتا – اندوتوكسينات" تبعا للنظام الذي وضعه Heimpel عام ١٩٦٦. هذا اسم عام وليس متخصص لوجود العديد من الدلتا-اندوتوكسينات الناتجة بواسطة عزلات مختلفة من بكتريا B.t. من الاهمية بمكان التمييز و المعرفة انه لا يوجد واحد فقط B.t. أو واحد فقط من Bt دلتا-اندوتوكسين.

انواع Bt تتكون من مجموعات من الميكروبات لكل منها خصائصه الخاصة به. بداية فان النوع يقسم الى تحت انواع أو طرز سيرولوجية تبعا للتفاعلات السيرولوجية للسوط الشبية بالخيط كما وصف قبلا. كل تحت الانواع هذه تعطي اسماء متميزة. تحت نوع Bt المسمي كورستاكي، جاليري، ايزاواي، موريسوني، تينيبريونيس، اسرائيلينسيز، ساندييجو تمثل مجموعة من الاسماء المعروفة الان. يوجد حاليا ما يزيد عن ٣٥ تحت نوع من Bt بالاضافه الى الاسماء أو الاقسام التى توضع باستخدام الانتيجينات السوطية اقتراح الباحثان Krywien czk and Angus (١٩٦٧) وغيرهم تقسيم سيرولوجي

للبلورات الموجودة في خلايا Bt من المثير للدهشة انه لاسيرولوجي الاسواط أو البللورات تشير الى انشطة الدلتا-اندوتوكسينات للعزلات المختلفة من .Bt.

هـــذا يقودنا الى ان العامل المفتاح أو المحدد لعزلات Bt محل التساؤل: الذي يجعل الـــنوع محـــل اهتمام كبير ومتميز ان التوكسينات الناتجة بواسطة العزلات المختلفة من بكـــتريا Bt تختلف في سميتها تجاه نفس نوع الحشرات أو تختلف في نشاطها الابادي ضد الحشرات . السؤال لماذا هذا الوضع وماهي التداخلات بين الدلتا-اندوتوكسينات المختلفة؟ هـــذا كله لم يرقي لمرحلة الفهم الكامل. لا جدال في ان هناك اوجه تشابه كبيرة فيما بينهما حيـــث انهـــا جميعا عبارة عن بروتينات ذات اوزان جزيئية عالية وجميعها يجب ان تؤكل وتهضـــم حتـــي تحقـــق الفاعلية (كيف يقولون ان Bt فعالة على بيض حشرة دودة ورق القطـــن) . كذلـــك يجـــب ان تكـــون هناك علاقة بين سيرولوجي تحت الانواع التى تنتج التوكسين ومدي النشاط و الفاعلية للدلتا-اندوتوكسينات التى تنتجها ولكن الارتباطات غير كاملة.

التركـــيز القاتل النصفي LC50 والوحدة الدولية : كما نوقش قبلا فان العديد ان لم يكـــن جمـــيع نواتـــج التخمر الفعالة بيولوجيا ذات جزيئات معقدة يصعب قياسها وتنقيتها كيميائيا . مع العناية المناسبة والطرق المناسبة يمكن عمل تقييم حيوي عالى الجودة للعديد مـــن المستحضرات الميكروبية. مازال التقييم الحيوي يستخدم على نطاق واسع مع العديد من المنتجات عريضة الانتشار على المستوي التجاري مثل فيتامين B12 والاريثرومايسين والبنســـيلين والعديـــد مـــن نواتج التخمر التى تبيد الحشرات entomocidal . بالطبع فان تكـــرار التقييم الحيوي من الامور الضرورية حيث ان استخدام ٣-٤ مكررات حيث يمكن تقليل الخطأ بقدر الامكان لاقل من ٢٠% على امتداد ٧ أيام. عن ميكانيكية التقييم الحيوي لبكـــتريا Bt نقول ان التقييم الحيوي يقارن التداخل بين حشرة الاختبار والتوكسينات تحت الظـــروف القياسية. الاستجابة الاكثر اثارة للحشرة من المعاملة بالمبيد الحشري الميكروبي وتلـــك الـــتى يســـهل ملاحظتها هي الموت. من اكثر طرق التعبير عن القتل دقة لعينات الباسيلليس Bt هم معيار "التركيز النصفي القاتل LC50" وهو التركيز النظري الذي يقتل ٥٠% من الحشرات. هذا التركيز يقدر بتعريض مجاميع من اليرقات لتركيزات مختلفة من العيـــنات في غذائها ثم تحضينها لفترة قياسية من الوقت وتسجيل النسبة المئوية للقتل لكل تركـــيز ثم استخدام تحليل الانحدار لتقدير LC50 لكل عينة. من الأهمية تحقيق دقة التقييم الحـــيوي كمـــا حددها العلماء Dulmage واخرون (١٩٨١)، de Barjac (١٩٨٤). لقد

اتفـق علـى أن سـر التقيـيم الحيوي الدقيق يكمن في استخدام المعايير القياسية. معظم مستحضـرات Bt تقـيم عـن طـريق المعيار القياسي LC50 وهذه تختلف من يوم ليوم بصرف النظر عن مدي العناية بحشرات الاختبار أو مدي تجانس الحشرات في المزرعة (جـدول ٤-٤، ٤-٥). هـذا التبايـن يمكن تقليصه بالتقييم الحيوي لمستحضر قياسي مع عيـنات الاختـبار باستخدام نفس مجموع الحشرات في كل فترات التقييم الحيوي ومقارنة LC50 للمركب القياسي في مقابل LC50 لعينات الاختبار(Dulmage واخرون ١٩٨٨). فـي الوقـت الحـالى تم الاتفاق على ثلاثة مواد قياسية كما أقرتها الهيئات العلمية. المواد القياسـية مدونـة في الجدول التالى حيث يستخدم المادة القياسية HD-1 في التقييم الحيوي ضـد حشـرات حرشفية الاجنحة بينما تتميز مركب IPS-82 كمادة قياسية ضد البعوض والذباب الأسود.

المادة القياسية	الكفاءة
Name of Standard	***Potency***
HD-1-S-1971	18.000 IU/mg*
HD-1-S-1981	16.000 IU/mg**
IPS-82	15.000 ITU/mg***

* U.S.D.A. Official Standard
** Proposed U.S.D.A. Replacement Standard
*** World Health Organization (WHO) Standard.

جدول (٤-٤) : حساب كفاءة المساحيق الجافة للدلتا-اندوتوكسينات للبكتريا Bt

١ ـ المعادلة أو الصيغة الاساسية:

كفـاءة عيـنة الاختـبار (IU/MG) = Lc50 للمستحضر القياسي / Lc50 عينة الاختبار X كفاءة المستحضر القياسي (وحدة دولية IU/ مللجم)

٢ ـ عندما تستخدم HD-1-5-1971 كمستحضر قياسي تصبح المعادلة:

كفاءة عينة الاختبار (وحدة دولية/مللجم) = Lc50 للمركب القياس HD-1-5-1971 / Lc50 عينة الاختبار X ١٨٠٠٠ وحدة دولية /مللجم

جدول (٤-٥) : الحسابات الافتراضية لنسب Tn / Hu المحتوية على واحد أو اثنين من الدلتا-اندوتوكسنات ذات المدى المختلف من النشاط

	Powder A	Powder B	powder C	powder D
Assays against Trichopluisa ni				
Lc50 standard, (ug/ml)	11.2	11.2	11.2	11.2
Lc50 sample, (ug/ml)	20.0	4.0	4.0	16.0
Potency of sample, (IU/mg)	10.00	50.00	50.00	12.500
Assays against Heliothis virescens				
Lc50 standard, (ug/ml)	2.8	2.8	2.8	2.8
Lc50 standard, (ug/ml)	5.0	1.0	2.0	2.0
Potency of sample, (IU/mg)	10.00	50.00	25.00	25.000
Tn/Hv ratio[a]	1.0	1.0	2.0	0.5

Source : Adopted from Dulmage, 1979, Activity ratios are discussed at length by Dulmage and Cooperators, 1981.

Note : Powder A and powder B are homologous to themselves and to the standard, and powder C and powder D are neither homologous to the standard nor to each other.

$$^{a}\text{Tn/Hv ratio} = \frac{\text{potency vs. Tni (IU/gm)}}{\text{Potency vs. H. virescens (IU/mg)}}$$

عن معايير تقييم دقة الاختبارات الخاصة بالتقييم الحيوي نشير الى النقاط التالية:

١- يجب ان تكون نسبة الموت في يرقات المقارنة اقل من ١٠% وهذا امر مطلق.

٢- يجب اختيار سلاسل من التركيزات حتي نصل الى خمسة تركيزات على الاقل مع عينات الاختبار وسبعة تركيزات مع المركب القياسي بما يحقق مالا يزيد عن ٩٠% أو يقل عن ١٠% موت.

٣- يجب ان يكون ميل منحنيات الانحدار معقول كذلك الذي يتحصل عليه من الميول السابقة ضد الحشرة تحت الاختبار وفي حدود اخطاء العينات اليومية والتى تتوافق مع بعضها.

٤- اذا كــان التحلــيل بالحاســب الالــي ميسرا فان حدود الثقة ٩٥% حول التركيز النصفي القاتل Lc50 يجب ان تكون كتلك الموجودة بين الحد الاقصي/ الحد الادني وتصل لاقل من ٢

٥- علــى نفس المنوال فان حدود الثقة ٩٥% حول الوحدة الدولية IU يجب ان تقدر كما ان النسبة بين الحد الاقصي /الحد الادني تكون اقل من ٢

٦- يجــب ان يكــون التقيــيم الحيوي على مدي ثلاثة ايام بشكل منفصل. الوحدات الدولــية تقــدر مع كل يوم من هذه الايام الثلاثة ثم يؤخذ المتوسط ويجب ان يقدر الانحراف القياسي ويكون اقل من ٠,٢. هذه البيانات يجب ان تستخدم لتقدير معامل التباين (٢٧) بين مكررات التقييم (الانحراف القياسي/المتوسط).

هــذه المعايير تسمح بالتخلص من المتاعب "trouble shoot" في المراحل المختلفة من التقييم الحيوي. لقد علمتنا التجارب ان معامل التباين (٢٧) بين التقييم الحيوي العقلاني يصل لاقل من ٠,٢ (ممكن ان تكون اقل من ١٥ ومع البعوض). المعامل الاعلى من هذه القــيمة يوضــح وجود خطأ ما مع عينة الاختبار أو في مزرعة الحشرة المستخدمة أو في الطرق التى يتبعها مسئولى التقييم الحيوي.

مــدي فعالــية و نشاط بكتريا الباسيلليس Bt: الجدول (٤-٦) يوضح مدي فعالية جزيء للدلــتا-اندوتوكســين التى ينتج بواسطة عزلات تقليدية من Bt . أظهرت النتائج ان مدي الفاعلــية للعــزلات الثلاثة من تحت النوع كورستاكي DH-1, HD73, HD263 تختلف بعضها البعض ولو انها تملك السيرولوجية السوطية. يلاحظ ان العزلات HD73 , HD-1 تخــتلف بعضها عن الاخر في سيرولوجية البللورات مما يتوقع معه اختلاف في الفاعلية. هــذا مــع ان العــزلات HD-263,HD-1 تخــتلف فــي مدي النشاط ولو ان لهما نفس ســيرولوجية الــبللورات. الاختلاف قد يتعارض. من المثير للدهشة مقارنة HD-73 مع HD-83 وهــي عــزلة تقليدية تحت النوع اليستي: العزلة HD-73 مع العزلات الاخري لتحت النوع كورستاكي فعالة ضد حشرات H-virescens,T-ni اما العزلة HD-73 غير فعالــة ضــد B.mori . علــى العكــس فان عزلات تحت النوع العسيتي غير فعالة ضد H.virescensأو T.ni ولكــنها شديدة الفعالة ضد B.mori أو H.cunea. لقد وجد ان

عزلة HD-182 تختلف عن كل العزلات الاخري في الفاعلية ضد H.cunea وليست ضد B.mori.

يمكــن ملاحظـــة وجود اختلاف هام ومميز عند انتاج التوكسينات بواسطة عزلات معظــم تحــت انـــواع .B.t بالمقارنة بالتوكسينات التى تنتج بواسطة عزلات تحت النوع اسرائيلينســـيز مثل HD-567 . الدلتا-اندوتوكسينات فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة بيـــنما هي قليلة الفاعلية ضد البعوض. عزلات تحت النوع اسرائيلينسيز على العكس قليلة الفاعلـــية أو عديمـــة الفاعلـــية ضـــد حشرات حرشفية الاجنحة ولكنها شديدة الفاعلية ضد الـــبعوض والذباب الاسود المائية. من المناقشات التي اظهرت اختلافات في الرؤي والاداء ماصـــرح بـــه كاتب المقال من ان سمية هذه التوكسينات لا تتوقف على تحت النوع. هذا الموقف يتجه نحو التعقيد خاصة عند تتسع مدي الفاعلية لتوكسينات .B.t من خلال اعتبار مـــدي واســـع مـــن انـــواع الحشـــرات عند تحديد النشاط سنوات عديدة ساد الاعتقاد ان الاندوتوكسينات للباسيليس BT فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة مع حالات قلة الفاعلية مـــع قليل من انواع البعوض. التطور التجاري لمستحضرات BT تتمشي مع هذه الاعتقاد كمـــا ان استخدام المستحضرات ذات الفاعلية على حشرات حرشفية الاجنحة زادت بشكل بطـــيء علـــى امتداد السنوات الخمس عشر الماضية. على سبيل المثال فان الاندوتوكسين المشـــتق مـــن تخمـــر تحت النوع كورستاكي (HD-1) يستخدم في مكافحة افات المحاصيل الحقلـــية مثل نطاط الكبريت T.ni وثاقبة الذرة الاوربية وافات المواد المخزونة و حشرات الدخان و الغابات وغيرها. لم يكن الاستخدام التجاري قاصرا على تحت النوع كورستاكي حيـــث اســـتخدم عزلات من تحت النوع aizawai ضد حشرة الشمع وكذلك تحت النوع سان ديجو لمكافحة الديدان القارضة.

جدول (٤-٦): مقارنة فاعلية ٩ عزلات من الباسيلليس تورينجينسيز ضد أربعة حشرات من حرشفية الأجنحة وخمسة أنواع من البعوض.

Culture	Subspecies	Cryst Type	Potency (IU / mg) T. ni	H. virescens	H. Cunea	B. mori	Mosquito Activity
HD-59	Thuringensis	thu	7.960	1.440	13.900	1.300	Inactive
HD-83	alesti	ale	Inactive	Inactive	93.200	27.500	Inactive
HD-1	kurstaki	k-1	39.800	15.400	47.200	50.500	Inactive
HD-263	kurstaki	K-1	39.600	54.600	18.100	18.400	Inactive
HD-73	kurstaki	k-73	29.300	34.500	15.400	inactive	Inactive
HD-168	galleriae	G-1	16.300	10.100	86.700	6.200	Inactive
HD-29	galleriae	G-9	6.760	341	inactive	7.400	Inactive
HD-135	aizawai	Aiz	18.000	1.460	134.100	75.900	Inactive
HD-567	israelensis	isr	inactive	inactive	inactive	inactive	High act.

لقـــد تم تقييم ووضع برنامج واسع بواسطة الباحث Dulmage واخرون (١٩٦٧) بهـــدف البحث عن عزلات اكثر كفاءة وفاعلية من البكتريا .B.T . لقد ادي هذا البرنامج الـــى اكتشـــاف العزلة HD-1 التى وجدت اكثر عنفا بمقدار من ١٠ وحتي ٣٠ مرة عن العـــزلات الســـابقة. لقـــد تـــبع ذلك بحوث مضنية بواسطة Goldberg and Margalit (١٩٧٧) للبحث عن ممرضات لمكافحة البعوض واسفرت عن الحصول على عزلات من تحـــت انـــواع جديـــدة للبكـــتريا .B.t (تحت النوع اسرائيلينسيز) ذات فاعلية عالية ضد الـــبعوض والذبـــاب الاســـود المائي. الملاحظات المبكرة التى اشارت الى ان القليل من العـــزلات لبكـــتريا Bt (بداية هي ضمن النوع HD-1-K-1) قليل الفاعلية ضد البعوض اخـــذت في الاعتبار في الدراسات الاكاديمية فقط. لقد اتسعت دائرة البحث عندما اكتشف ان التوكسين الناتج من انواع جديدة من الباسيلليس سفيريكس شديد الفاعلية ضد البعوض. بعـــد ذلك اظهرت التجارب الحقلية ان عزلة H-14 فعالة حتي المستويات الاقتصادية. لقد كان الكشف عن تحت النوع اسرائيلينسيز عامل مساعد ومحفز للبحث عن عزلات اخري من البكتريا Bt التى تنتج دلتا-اندوتوكسين فعال ضد رتب اخري من الحشرات. لقد كللت هـــذه الـــبحوث بالنجاح رغم البطيء وبعد ٢-٣ سنوات اكتشف تريج واخرون (١٩٨٣) تحت نوع جديد من Bt وهي تينيبريونيس الذي ينتج دلتا-اندوتوكسين فعال ضد العديد من حشـــرات غمديـــة الاجـــنحة خاصة خنفساء الكلورادو. نفس الشيء حدث مع تحت النوع ســـاندييجو الفعال ايضا ضد غمدية الاجنحة. مازال الطريق مفتوح للحصول على عزلات جديدل على عزلات جديد لفعال ضد البعوض.

نســـب الفاعلـــية ActivityRatios: كمـــا نوقش قبلا فان التقييم الحيوي يعتبر مقياس للنشـــاط و الفاعلية ولكنه لا يعتبر مقياس دقيق يحدد المادة التى تؤخذ كاسس للمقارنة و كالمـــيزان. الوحـــدة الدولـــية IU التى تقدر في التقييم الحيوي لبكتريا Bt تعكس السمية النسبية للعينة تحت الاختبار مع المستحضر القياسي ضد انواع الحشرات المدروسة. لذلك فـــان IU الـــتى تســـفر عـــنها تجـــارب التقييم الحيوي تعتمد ليس فقط على كمية ونوع الاندوتوكســـين فـــي المسحوق ولكن كذلك على الحشرات المستخدمة في التقيم الحيوي. بالطـــبع فـــان الوحـــدات الدولـــية IU,S التى يتحصل عليها مع التقييم الحيوي لمسحوق البكتريا ضد الحشرات من الانواع المختلفة لا يمكن ان تكون متشابهة الا اذا كان التوكسين محـــل التقييم متماثل مع نظيره القياسي. هذا التصور ادي الى العديد من التساؤلات واجبة الاجابة و التفنيد نذكرها فيما يلي:

١- اذا كانت العينة القياسية وتلك المعرضة للاختبار تحتوي على نفس الدلتا- اندوتوكسين فان الوحدات الدولية IU,S التى تقدر في التقييم الحيوي ضد انواع حشرية مختلفة لابد وان تكون متطابقة (في هذه الحالة كاننا نقارن بين التوكسين ونفسه).

٢-اذا كانت الوحدات الدولية IU,S المقدرة في التقييم الحيوي على نوعين مختلفين من الحشرات متطابقة فان هذا يعتبر دليل وليس دليل استدلالى ان عينة الاختبار متجانسة ومتماثلة مع المستحضر والمادة القياسية.

٣- اذا كانت الوحدات الدولية غير متماثلة أو متطابقة بين نوعي الحشرات المختبرة كان ذلك دليلا على عدم تجانسها مع المادة القياسية.

٤-التشابه (أو عدم التشابه) لبكتريا Bt يمكن تقييمه كميا بواسطة نسبة رياضية بسيطة. يطلق على هذه النسبة "نسبة الفاعلية activity ratio" .

٥- نسبة الفاعلية وحدها لا تستطيع التمييز بين الانواع المختلفة من بكتريا Bt. الوحدات الدولية تقيس كمية اندوتوكسين Bt في المسحوق أو ناتج التخمر حيث ان التركيز النصفي القاتل Lc50 يعتبر وسيلة جيدة للقياس. معامل التباين يوضح نوع اندوتوكسين Bt الموجود مع استخدام نسبة النشاط كمقياس.

نسبة النشاط يمكن ان تستخدم للمقارنة بين نوعين حساسين من الانواع الحشرية. لكي نتجنب سوء الفهم أو التشويش يكون من الضرورى اتباع طريقة مناسبة لتحديد أي من الانواع الحشرية تستخدم في حساب النسبة. في هذا المقام قام الباحث بوضع الحرف الاول من الاسم الشائع للجنس و الحرف الاول من إسم النوع لتوضيح نوع الحشرة ومكان الحشرة في الجزئية. لذلك فان Tn = T. ni ،Hv = H. virescens ونسبة الفاعلية تعرف على النحو Tn/Tv . الجدول (٤-٤) يوضح حساب نسبة الفاعلية بناء على التقييم الحيوي ضد T.niو H. virescens

يمكن استخدام معامل التباين (٢٧) Coefficient of variation لتقييم نسبة الفاعلية. الجدول (٤-٧) يوضح قيم نسبة النشاط حيث يوضح فاعلية مساحيق تحت النوع كورستاكي (HD-1) المقاسة في التقييم الحيوي بين H. virescens, T.ni . المساحيق انتجت في اوساط مختلفة و متعددة كما تختلف عن بعضها البعض في الفاعلية. معامل التباين لمختلف المساحيق بلغت في المتوسط ١٩٢ و هي في حدود الخطا التجريبي. مما يوضح ان التوكسينات الموجودة في كل مسحوق هي نفسها بالرغم من الاختلافات في

كميات المسحوق الناتجة أو الوسط الذي تنتج فيه. الاسهام الاكثر اهمية لمعامل التباين يتمثل في المساعدة في التفريق بين نسبة الفاعلية بطريق مشابه للتفرقة بين كفاءة مساحيق بكتريا Bt. اذا كان معامل التباين اقل من ٣٣ و فانه يفترض انها تنتمي لنفس المجموعة اذا كان معامل التباين اكبر من ٣٣ و فانة يفترض ان بعض المساحيق في المجموعة ينتمي الى مجموعات مختلفة . التقييم الحيوي للمساحيق الفردية يمكن ان يتأرجح في وقت معين بين المجاميع حتي يتحصل على توزيع ما يتوائم مع العديد من المساحيق بقدر الامكان في مجاميع. هذه ليست طريقة احصائية موثوق فيها ولكنها يمكن ان تتبع للتفرقة بين الانشطة المختلفة و بسرعة و بسهولة.

جدول (٤-٧): تأثير الوسط على انتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة سلالة الباسيلليس تورينجيسيز HD-1 في وحدة تخمر ١٤ لتر.

Medium Ingredients (g/liter)[a]				Yield Kiu/ml)[b]		
Experiment No.	Cottonseed flour	Glucose	Corn steep	Trichop-lusia ni	Heliothis virescens	Tn/Hv Rastion c
1	20	15	-	414	298	1.39
	30	40	25	834	365	2.28
	30	20	25	893	472	1.89
2	20	15	10	711	278	2.56
	30	40	10	797	381	2.09
	30	40	10*	515	246	2.09
3	30	40	50*	1730	-	-

-[a]All media, except those designated by *media contained yeast extract, 2.0 : peptone, 2.0 ; MgSO47H2O, 0.3 ; FeSO4, 7H2O, 0.02 ; ZnSO4, 0.02 ; CaCO3, 1.0.

-[b]Measured against T. ni and H. virscens, using HD-1-S-1971 as a referenced standard, HD-1-S- 1971 conTAINS 18.000 IU/mg = international units x 103

-[C]IU /ml measured against T. ni divided by IU/ml measured against H. virescens. Reproducibility of Tn/Hv ratio : n = 6 ; Avg.= 2.050 ; SD = 0.394 ; CV = 0.192.

المعـــيار فـــي عملـــية تخمرات بكتريا Bt نالت الكثير من الاهتمام ولو ان عملية الـــتخمر ســـهلة الاجراء بوجه عام دون اية طلبات خاصة للنمو او تكوين البللورات. ليس هناك دراسات لكل المعايير بنفس التفصيلات ولكن مادرس يشير الى اهمية درجة حرارة التحضـــين. الجدول (٤-٨) يوضح ان النمو والمحصول الناتج متساوي تقريبا مع درجات حـــرارة مـــن ٢٦ وحـــتى ٣٤م . على درجة حرارة ٣٧م أظهر الفحص الميكروسكوبي للخلايـــا فـــي وحدة التخمير وجود شرائط طويلة من الخلايا ومحصول قليل بشكل كبير. لذلـــك لا توجـــد مـــيزة لتنمية مزارع Btعلى درجات الحرارة العالية بهدف الانتاج لذلك نضبط الحرارة على درجة ٣٠م في وحدات التخمر.

جـــدول (٤-٨) : تاثـــير حـــرارة التحضين على نمو وانتاج الدلتا-اندوتوكسين بواسطة الباسيلليس تورينجيسنيز السلالة HD-2b3 في وحدة تخمر ١٤ لتر.

حرارة التحضين (C)	أقصي محصول مع الساعات	عدد الجراثيم (x 10)	المحصول وحدة دولية لكل مملیلتر
37	39-42	80	283
34	18-24	170	1.150
30	34-39	220	1.500
30	39	240	1.450
26	39-42	200	1.630

[a]Measured against Heliothis virescens ; Kiu = International Unitsv x 10^3

الـــتهوية عـــامل هام جدا في تخمر Bt حيث اوضح دفاج واخرون وفودة واخرون (١٩٨٥) الصـــعوبة الشديدة لتنمية واصلاح Bt خلال الساعات العشر الاولى من التخمر المغمـــور بسبب الحاجة الكبيرة للاوكسجين. عن ثبات نسبة الفاعلية تم الاختيار العشوائي لخمســـة عزلات من بكتريا Bt تحت مدي واسع من الظروف واجري التقييم الحيوي ضد حشرة دودة اللوز الامريكية. اظهرت النتائج المتحصل عليها في جدول (٤-٩) انه بالرغم من وجود مدي واسع من الانتاج بين الطرز السيرولوجية المختلفة فان معامل التباين لهذه المستحضـــرات جميعا كان ثابتا. لقد كان معامل التباين للمساحيق المختلفة قريب جدا من المـــدي ٢٣. وحتي ٣٢. من الناحية العملية فان الشركةالتى تنتج Bt يجب ان تكون قادرة علـــى الاعـــتماد والوقوف في ثبات كفاءة وفعالية التوكسين من تحضيره لاخري او تكون

تكالـيف العملية باهظة. يطلق على ثبات النتيجة من التقييم الحيوي او غيره الاصطلاح " "reproducibility

استـرجاع الناتج الفعال من وحدات التخمر Recovery : طريقة الاسترجاع من التخمر علـى المسـتوي المعملى للتخمر (١-٢ لتر) موضحة في الجدول (٤-١٠). الاسترجاع المسـتخدم مـع رج اواني التخمر تعني طريقة تحضير مع طرد مركزي اولى في اطباق جهـاز الطرد المركزي. من المهم اضافة الاسيتون ببطيء والسماح بالثبات لمدة ٣٠ دقيقة قبل الترشيح في اوعية الشفط باستخدام ورق ترشيح واتمان ٢ # في هذه المرحلة وعندها يحدث ترشيح سريع ومن ثم مشاكل ماعدا الناجمة عن الغسيل غير اللائق بالاسيتون.

جدول (٤-٩) : ثبات نسب الفاعلية لمستحضرات من تخمر خمسة عزلات من باسيلليس تورينجينسيز في مخمر سعة ١٤ لتر

المزرعة	عدد المستحضرات المختبره (a)	متوسط النسبة Tn/Hv	معامل التباين
HD-1	60	2.40	0.25
HD-129	59	5.63	0.32
HD-241	26	0.63	0.24
HD-244	26	1.54	0.23
HD-263	136	0.44	0.29

[a]Includes formulations from different media or fermentation conditions and from different times of harvest.
[b]International unit (IU) /ml measured against Trichoplusia ni divided by IU/ml measured against Heliothis virescens IU determined against HD-1-S-1971 as a standard. HD-1-S-1971 contains 18.000 IU/mg

تـبرز مشاكل مختلفة عند تجفيف الرش في مصنع الإنتاج (جدول ٤-١١) حيث يـتم استخدام طرد مركزي مع انسياب مستمر ومع هذا قد نواجه مشاكل مع مواد صلبة عديـدة تضـطرنا لايقـاف العملية والبداية مرة اخري. هذه تمثل مشكلة ميكانيكية (ليست مشـكلة اسـترجاع) حرارة الدخول والخروج يجب ان تتوافق تبعا لعملية الانتاج. في هذه المـرحلة يتم اضافة أي ماد مساعدة للبلل او الانتشار الى العجينة التى نستهدف الحصول على المستحضر النهائي منها كلا الطريقتان يسهل اتباعها مع قليل من الفقد في الفاعلية.

جـدول (٤-١٠) : عملية استرجاع معقد الجراثيم- البللورات للباسيلليس تورينجينسيز على مستوي المعمل.

الرائق (يستبعد)	المكونـات الكلية- حموضة ٨,٤-٨,٧ في المخمر ضبط الحموضة الي (٧) بواسطة حامض يد كل ــ طرد مركزي للبقايا
	يقلب في ١/١٠ – ١/٢٠بالحجم ٤-٦ % لاكتوز يضاف ببطيء مع الرج ٤-٥% بالحجم اسيتون يقلب لمدة ٣٠ دقيقة ثم يترك لمدة ١٠-٣٠ دقيقة
الراشح (يستبعد)	الترشيح مع الشفط ثم يقلب المخلفات مع الرج مع حجم صغير من الاسيتون.
الراشح (يستبعد)	الترشيح مع الشفط وتقلب البواقي مع حجم قليل اسيتون
الراشح (يستبعد)	الترشيح مع الشفط و يخفف طول الليل

جـدول (٤-١١): عملـية استرجاع معقد الجراثيم / البللورات للباسيليس تورينجيسيز:

إنتاج على مستوي اكبر في المصانع

تجفيف الرش

↓

كل المكونات = درجة حموضة ٨,٤ – ٩,٠

↓

طرد مركزي (مع انسياب مستمر)

↓

بقايا او مخلفات (قشدي ثقيل)

تجهيز العجينة (بناء على وزن القشدة)

يضاف ١٠% لاكتوز، ١٠% مادة ناشرة، ١٠% مادة مبللة)

↓

خلط متجانس

↓

ضبط المكون الصلب الكلى لحوالى ٢٠%

↓

الرش الجاف (تغذية بشبورية بالطرد المركزي)

حرارة الدخول ١٢٥-١٥٠م

حرارة الخروج ٧٥-١٠٠م

↓

المستحضر

الاستقراء من التجارب المعملية الى الحقلية Extrapolation:

مـــن المعـــروف ان الممرضـــات البكترية والفيروسية للحشرات كلها تعمل كسموم معديـــة Stomach poisons حيث يجب ان تقوم الحشرات باكل وهضم الممرضات حتي تحـــدث الفاعلية وسوف اكتب هاتين العمليتان بالانجليزية كي بتاكد من يقولون بتاثير هذه المستحضرات خاصة Bt على بيض الحشرات.

Bacterial and viral insect pathogens all act as stomach poisons. They must be eaten and digested to be effective.

يجـــب ان نؤخـــذ هذه الحقيقة في الاعتبار في أي برنامج لاستخدام هذه الممرضات ليكـــن معلوما انه ليست كل حشرة حساسة للممرض الحشري. بيئة ومكان معيشة الحشرة قـــد تجعـــل من الصعوبة تحقيق التلامس بين الحشرة ومسبب المرض. مثال ذلك انه عقد مقارنـــة فعالـــية مستحضر HD-1 في المعمل مع مستحضر دودة اللوز القرنفلية والشوكية نجده اكثر فعالية ضد دودة اللوز القرنفلية ثم .T.ni في الحقل يحدث العكس حيث لا ينجح HD-1 في مكافحة دودة اللوز القرنفلية ولكن يكافح T.ni في حقول القطن. السبب بسيط وهـــو يتمـــثل فـــي ان حشرة T.ni تقضي ساعات التغذية على سطح اوراق القطن وهي المساحات المغطاة جيدا بالمستحضر HD-1 من جهة اخري فان بيض دودة اللوز القرنفلية توضع بالقرب من النموات الجديدة الطرفية النامية وبراعم نباتات القطن كذلك فان اليرقات حديـــثة الفقـــس تثقب في الحال البراعم والنموات الطرفية ومن ثم تهرب من التغذية على البكـــتريا Bt مـــرة اخـــري اقول للزملاء في معهد بحوث وقاية النباتات ومركز الهندسة الوراثـــية التابعيـــن امركز البحوث الزراعية ــ وزارة الزراعة : بالله عليكم كيف يقضي مستحضر Bt الاجرين المحلي العظيم الانجاز على بيض دودة ورق القطن؟

مـــن الناحـــية النموذجـــية فان الحشرة المستهدفة التى تستخدم في اختبارات التقييم الحـــيوي فـــي المعمل يجب ان تكون هي نفسها التى يراد مكافحتها في الحقل. في بعض الاحـــيان يكون ذلك مستحيلا لان اعداد المعمل للحشرات المستهدفة المتاحة محدود بسبب عـــادات الحشرة في التغذية والمعيشة وامكانيات وقدرات المعمل. في هذه الحالة قد يكون مـــن الضـــروري اجراء اختبارات التقييم الحيوي على حشرة بديلة. هذا يمثل جانب كبير مـــن الخطـــورة لان مدي الفاعلية للممرضات المختلفة او المستحضرات المختلفة يختلف بشـــكل كبير كما نوقش قبلا. انواع من نفس الجنس ليس من الضروري ان تستجيب بشكل مـــتماثل مـــع الدلتا ــ اندوتوكسينات المختلفة. مثال ذلك فان استجابة حشرات دودة ورق القطـــن و الـــدودة القارضة للبكتريا Bt المختلفة سواء في المعمل او الحقل غير متماثلة.

نفـس الوضـع مع ديدان اللوز H.zea , H.virescens حيث استجابتها في المعمل تختلف عن الحقل لمستحضرات Bt.

تصميم برنامج تقييم حيوي للمفاضلة بين المستحضرات المختلفة Screening

الاصطلاح " برنامج المقارنة بالاختبار Screening program ' ربما يكون مشتق من العملية التى يقوم بها عمال البناء من فصل الرمل الى درجات بداية الدقيقة والمتوسطة والخشنة. البناء لا يستطيع نخل الرمل لفصل كل هذه الدرجات في نفس الوقت. يجب عليه ان يجـري نخـل متتابع للحصول على الدرجة المطلوبة وفصلها. السؤال الان هل هذا ما يحـدث فـي بـرامج المفاضـلة التجريبية مع ممرضات الحشرات. يجب علينا ان نصمم برنامج خطواتي عقلاني ومعقول يعمل على انتخاب وتوكيد وتعضيد المزارع الفعالة محل البحـث. الهـدف يتمثل في وضع برنامج يعمل على الكشف عن العزلات الفعالة من بين اعـداد المعايير المرغوبة في برنامج كالذي نحن بصدده وحيث المزارع الميكروبية يحكم عليها عن طريق مقدرتها لقتل الحشرة المستهدفة ومن ثم يكون المعيار المناسب هو النسبة المـئوية للقـتل. يجب ان نتذكر ان الاختبار الذي نقوم به يعتبر اختبار حيوي وفيه يوجد تبايـن وراثـي معقول. القرار يجب ان يكون تحكمي او اعتباطي بناء على خبرة الباحث الوسيلة المعقولة لاختبار تزكية معيار معين تتمثل في " نسبة مئوية قاطعة "Cut –off و هـي تعني نسبة القتل التى تقبل كدليل للتعبير عن الفاعلية وهي يجب الا تزيد عن ١٥-٢٠% مـن المزارع تحت الاختبار. هذا سوف يؤدي للكشف عن معظم العزلات فاعلية ولكـنه سوف يسمح باختبار بعض العزلات غير الفعالة. برنامج التقييم الحيوي التفضيلي يجـب ان يكـون بسيط بقدر الامكان مع Bt المستخدمة في الاختبار والناحية على ١٠٠ ملليمـتر مـن البيـئة. العزلات التى تنجح مع هذا التقييم الاولى يتم اعادة عزلها واعادة اختـبارها تحت نفس الظروف كما في الحالة الاولى. العزلات التى تمر من التقييم الثاني بنجاح يعاد اختبارها وتوضع في اطباق اجار مغذية ويتم عزل من ٥-١٠ مستعمرات من البكتريا Bt كمزرعة مرجعية.

REFERENCES

Barjac, H., de and Larget-Thiery, I (1979). Proposal for the adoption of a standardized from serotype H-14 of Bacillus thuringiensis. WHO /VBC/79., 744.

Barjac, H., de and Larget-Thiery, I (1984). Classification des souches du Bacillus thuringiensis par la determintion de 'lantigene flagellaire. Entomophage, 8, 223-229.

Dulmage, H.T. (1973a).Assay and standardization of microbial insecticides. Ann. N.Y.A cad. Sci. 217, 187-199.

Dulmage, H.T. (1973b). Bacillus thuringiensis U.S. assay standard. Report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay of formulations containing the delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis. Bull. Entomol. Soc. Am. 19. (4), 200-202.

Dulmage,H.T. ;Martinez, A.J. and pena, T. (1976). Bioassay of Bacillus thuringiensis (Berliner) delta-endotoxin using the tobacco budworm.U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 1528, 16 pp.

Dulmage, H.T. (1979). In 'Genetics in Relations to insect Management' M.A. Hoy and T.I. Mckelvey. Eds. Pp. 116-127. working papers. The Rockefellows foundation 1979.

Dulmage, H.T. and Cooperators, (1981). Insecticcidal activity of isolates of Bacillus thuringiensis and their potential for pest control. In microbial control of pests and plant Diseases, 1970 – 1980 ed. H.D. Burges, 191-220. London : Academic press.

Dulmage, H.T. ; Mclaughlin, R.E. ; Lacey , L.A. ; couch T.L. Alls, R. T. and Rose, R.I. (1985). Aproposed U.S. standard bioassay for the potency assessment of Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis H-14. Bull. Entomol. Soc. Am., 31,31-34.

Dulmage, H.T. ; Correa, J.A. and Morales, G.M. (1989). Problems and progress in the development of microbial insect control agents, Israel. Journal of Entomology.

Dulmage, H.T. (1989). Production and use of Bacillus thuringiensis. Perspective from 1989. Mem inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 84, supl. 113-122.

Dulmage, H.T ; Gallegos-Morales, G.and correa, J.A. (1990) Potential for improved formulations of Bacillus thuringiensis subsp israelensis through standardization and fermentation development. In Bacterial control of Mosquitoes and Blackflies ; Biochemistry, Genetics and Application of Bacillus thuringiensis subsp israelensis and Bacillus sphaericus. H. de Barjac and D. Sutherland , eds. 110-133.

Foda, M.S. ; Salama, H.S. ; and salem , M. (1985) factors affecting the growth physiology of Bacillus thuringiensis.Appl. Microbiol. Biotechnol. Bioeng. 22, 50-52.

Goldberg, L.J. and Margalit, J. (1977) Abacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against anopheles sergentii. Uranotaenia unguiculata, culex univittues Aedes aegypti and culex pipiens. Mosq. NEWS ,37 (3), 355-358.

Heimpel, A.(1967). A taxonomic key proposed for the species of crystalliferous bacteria . J. invertebr. Pathol. 9, 364-375.

Kireg, A. (1983). Insect pest control in plant protection by Bacillus thuringiensis preparations and their influence on the environment. II., Bekampfung von Anz. Schadlingskd. Pflanzenschutz. Umweltschutz V. 56 (3), 41 -52.

Krywienczyk, J. and Angus, T.A. (1967). Aserological comparison of several crystalliferous insect pathogens. J. Invertebr. Pathol., 9, 126-128.

Krywienczyk, J.; Dulmage, H.T. (1967). A serological comparison of several comparison of several crustalliferous insect pathogens. J. Invertebr. Pathol., 9,126-128.

Krywienczyk, J. ; Dulmag, H.T. and Fast , P.C. (1979). Occurrence of two serologically distinct groups within Bacillus thuringiensis serotype 3ab var. kurstaki. J. Invertebr. Pathol., 31, 372-375.

٢- طرق بسيطة لاستخدام باسيلليس توريـنجينسيز في المحاصيل الحقلية بما يتلائم مع الدول النامية.

فاعلية الباسيلليس تورينجنسيز (Bt) في مكافحة الافات الحشرية تاكدت بسبب الجهد المضني الذي اجراه Steinhaus في اوائل الخمسينات. هكذا بدأ الباحث K.A.Jones من معهد المصادر الطبيعية في انجلترا. هذا مع ان مرضية البكتريا على الحشرات عرفت قبل هذا التاريخ. في الحقيقة فان البكتريا عزلت منذ زمن بعيد حوالى عام ١٩٠١ وتم وصف النوع بواسطة Berliner في عام ١٩١١ ولكن كان الباحث ستينهاوس اول من أشار الى امكانية الاستخدام التجاري لهذه البكتريا في مكافحة الحشرات. منذ ذلك الوقت تزايد الاهتمام باستخدام بكتريا Bt بشكل تدريجي وحتي عام ١٩٧١ حيث تم تسجيل ٢٣ نوع من الحشرات يمكن مكافحتها بواسطة البكتريا على اكثر من ٢٠ محصول (Falcon ١٩٧١). في السنوات الاخيرة زاد الاهتمام بشكل غير مسبوق عن فاعلية ومقدرة Bt في مكافحة الحشرات. لقد كان ذلك بسبب ونتاج العديد من العوامل التى تشمل الاهتمام المتزايد بالمشاكل التى احدثتها وتحدثها المبيدات التقليدية خاصة وجود مخلفات سامة في كل من المكونات البيئية. العامل الاخر يتمثل في تطور المقاومة لفعل المنبيدات ونقص فرص اكتشاف مجاميع جديدة من المبيدات الكيميائية. كذلك فانه خلال السنوات الخمسة وحتى العشرة الاخيرة اتخذت خطوات كبيرة في اتجاه تطوير بكتريا Bt كمبيدات لقد تضمن ذلك عزل وانتخاب سلالات جديدة فعالة على مدى واسع من الافات الحشرية مثل B.t. tenebrionis لمكافحة حشرات غمدية الاجنحة (Krieg واخرون ١٩٨٣). وكذلك تطوير تكنولوجيا الانتاج مما ادي الى تقليل التكاليف بالاضافة الى تحسين المستحضرات لزيادة الثبات على الهدف وتحقيق المكافحة الفعالة المقبولة. كذلك تطوير اسلوب المناورة الوراثية بما فيها ادخال او زرع جينات السمية في النباتات المهندسة وراثيا (Arion، ١٩٩١) والبكتريا الاخري (Gelernter، ١٩٩٠). بالاضافة الى ذلك فانه من خلال تفاعلات الارتباط Conjugation امكن تطوير سلالات فعالة ضد حشرات ثدنية الاجنحة وحرشفية الاجنحة معا (كما في دراسات و مخرجات بحوث العالم Federici، ١٩٩٠).

في الوقت الراهن فان بكتريا Bt تمثل ما يقرب من ٨٠-٩٠% من سوق المبيدات الحشرية الميكروبية العالمية والتى تصل الى حوالى ١٠٠ مليون (كارلتون، كاورون - بيرك، جونسون ١٩٩٠) في الدول النامية مازالت كفاءة Bt محل الاعتبار ومازال العديد من البحاث يحاولون تعظيم دورها في المكافحة وزيادة مجالات الاستخدام. مع تكنولوجيات

المكافحــة الجديــدة فــان مستحضرات Bt يجب ان تصل الى الحشرة حتي تحقق الفاعلية باســتثناء النــباتات المهندســة وراثيا فان هذا يعني ضرورة استخدام Bt على المحصول بطــريق او اخر. بوجه عام فان هذه الجزئية اهملت في تطور مكافحة الحشرات بواسطة بكتريا Bt.

متطلبات التطبيق: تعمل بكتريا Bt بالضرورة كسم معدي Stomach poison ومن ثم يجب ان يتم تناولها بواسطة الحشرة المستهدفة. أي طريقة تطبيق يجب ان توصل بكتريا Bt الى المنطقة من المحصول التي تاكلها الحشرة. هذا ليس بالامر السهل. اذا اخذت دودة ورق القطــن كمــثال لانها من الآفات الخطيرة التى تهاجم زراعات القطن في مصر ويتم مكافحــتها عــن طــريق الجمــع الــيدوي للطع البيض واتمام المكافحة بواسطة المبيدات الكيميائــية الحشرية (حسني ، ١٩٨٠). الحشرة من أكلي الأوراق النباتية ولو ان الاطوار المتأخرة تهاجم الثمار أي اللوز ومن ثم تعتبر هدف جيد للمكافحة بالمبيدات الميكروبية بما فيها بكتريا الباسيلليس Bt . اهداف المكافحة تتمثل في الأطوار الثلاثة الاولى والتى تحدث اقل ضرر تراكمي والذي قدر باقل من ٢% من التلف الكلى الذي تسببه الاطوار اليرقية (Googyear ١٩٧٨) كمــا انهــا اكــثر حساسية للمستحضرات الميكروبية. هذه الاطوار الحشــرية تقع في اتجاه قمة النبات على السطح السفلي من الاوراق (ابو النصر واخرون ١٩٦٠ ، خلــيفه واخرون ١٩٨٢) حيث تاكل وهذا هو المكان المناسب لرش المستحضر واى محلــول حــيوي او غــيره يقع ويستقر على مواضع اخري تعتبر مفقودة. على نفس المــنوال فــان الفراشة ذات الظهر الماسي بلوتيللا زيلوستيللا من الحشرات الكبري على النباتات الصليبية على مستوي العالم توجد كذلك على الاسطح السفلي للاوراق حيث تحفر الاطوار الصغيرة في الاوراق بينما الاطوار الكبيرة تاكل البشرة السفلي فقط (هيل ١٩٨٣)

طبيعة الاختفاء او الستر للعديد من الحشرات تخلق مشاكل حادة في طريق التطبيق. فــي وســط امريكا تعتبر حشرات Heliothis من افات الذرة الخطيرة حيث تتغذي على الاوراق . انــواع Heliothis و Helicoverpa من الافات الكبري للقطن حيث انها بعد الفقــس من البيض تتحرك بسرعة كي تتغذي عل الاجزاء الثمرية مع اقل تغذية قليلة على الاوراق (Pearson ١٩٥٨) فــي هــذه الحالة فان التوزيع المتجانس للرش يكون مطلوب لكــي يمكــن الحشرة من الملامسة و التناول للباسيلليس Bt قبل ان تدخل البراعم واللوز حيث انها اذا دخلت فانها تعتبر في غير تناول المكافحة بواسطة Bt .

اختيارات التطبيق: من اكثر الطرق الواسعة الانتشار المستخدمة لتطبيق وتوزيع المبيد تكون خلال الرش. لقد تعرضت هذه الجزئية لكم هائل من البحوث على امتداد سنوات عديدة بهدف ايجاد الطرق مباشرة لاستخدام المبيدات الحشرية الكيميائية. بكتريا Bt تعتبر سم معدي ولذلك يمكن القول ان كل المبيدات تتطلب تطبيق ومكافحة دقيقة في الموقع المستهدف للحشرة. السموم المعدية تمثل متطلبات المستقبل الواجب استخدامها على موقع تغذية الحشرة. سوف نركز مناقشاتنا في هذا السبيل على التطبيق الارضي. من جهة اخري فان الرش الجوي يقدم تغطية مناسبة للاشجار ويستخدم على نطاق واسع على مستوي العالم لرش المبيدات الحشرية في المساحات الكبيرة للزراعات الحقلية. من الثابت انه مع المحاصيل الحقلية فان الرش الجوي غالبا لا يحقق تغطية جيدة للسطح السفلي لاوراق النباتات اولا تحقق الوصول للمباحات المتجاورة من النبات وهو احد المتطلبات لتحقيق مكافحة فعالة للمبيدات الميكروبية. من النواحي الاكثر اهمية تشير الى ان الرش الجوي لا تعتبر من الخيارات المطروحة امام صغار المزارعين في الدول النامية. لهذا السبب فان استخدام الرشاشات المجمولة على العربات لا تؤخذ في الاعتبار كذلك.

من اكثر الطرق المستخدمة في التطبيق الارضي استخدام الرشاشات الظهرية. توجد تصميمات عديدة مختلفة من هذه الرشاشات ولكن الاساس العام واضح وواحد. يتم خروج الرش خلال ذراع وبشابير الى المحصول. حجوم الرش عادة تكون ١٠٠ لتر / هكتار او اكثر. الحامل يمكن ان يوجه الرش على المحصول ولكن في العديد من المواقف فان التغطية للاوراق السفلية و السطوح السفلية لها تكون فقيرة. باستخدام هذه الرشاشات يصبح في الامكان لعامل الرش توجيه الرش على الثمار او ثنيات الاوراق في نباتات الذرة. من الرشاشات الاخري ذات الحجم الكبير والرشاشات الالية ذات الحامل في مصر. هذه الرشاشات تخرج ٤٠٠-٦٠٠ لتر/هكتار. مع هذه الحجوم يمكن رش النباتات حتي يتساقط محلول الرش وتقع الكثير من قطرات المادة الفعالة على الارض. اذا لم يتم توجيه الرش بعناية فان نسبة قليلة من الرش تصل الى السطوح السفلي من الاوراق.

في العشرين سنة الاخيرة حدثت تطورات في تكنولوجيا التطبيق لتحسين استقرار سائل الرش على الهدف وتقليل الانجراف وما يستتبعه من تلوث بيئي مع المبيدات الحشرية وعن طريق تقليل حجوم الرش وجعل الرش اسهل من النواحي الطبيعية على القائم بالتطبيق. لقد امكن تحقيق ذلك من خلال استخدام نظام التطبيق الذي يتحكم في القطرات (CDA) استخدام رشاشات الحجم القليل ذات القرص المغزلى تم التوصية بها لمكافحة الحشرات على العديد من المحاصيل بما فيها القطن (Mowlan ١٩٧٣) ومن

شــك فــان غطاء الرش الذي يتحقق بواسطة هذه الرشاشات تكون جيدة جدا على السطح العلوي للورقة خاصة في الاجزاء العليا والقمية من النباتات. من الخبرات المكتسبة تكونت لدينا قناعة بان تغطية السطح السفلي للورقة يكون فقير جدا كما ان نفاذية الرش في بعض المحاصــيل مــثل البرسيم تكون فقيرة كذلك. التحسين في تغطية الاوراق السفلية للقرص المغــزلى ورشاشــات CDA امكــن تحقــيقها من خلال تطوير الرش الالكتروستاتيكي وتكنولوجياته كما في رشاشة الكترودااين التى طورتها شركة ICI انذاك (Coffee ١٩٧٩) والرشاشة الخاصة بالتجارب ABE 80 في محطة بحوث روتامستيد في انجلترا (ارنولد وباي ١٩٨١). لقد حقق ذلك تحسين مؤكد في تغطية الاوراق السفلي (Mathews ١٩٨٢ و Jones ١٩٩٠) ولكــن رشاشــة الالكترودااين لم تنتشر في الدول النامية كما ان رشاشة ABE غــير مــتاحة تجاريا. الفلاحون الذي يملكون ويستخدمون الرشاشة الظهرية سوف يستمرون في استخدام هذه الرشاشة خاصة لانهم يعرفون ان هذه الرشاشات قابلة للتطوير والتحسين.

مــن هــذا الاســتعراض يتضح لدينا اننا في حاجة للنظر في تحسين التغطية التى تحققهــا الرشاشات التقليدية. في مصر تم مقارنة اداء الرشاشات الظهرية التى ترفع على حامل التشغيل والالية مع الرشاشات المروحية ذات المغزل. اظهرت التجارب على القطن ان كــل هذه الرشاشات يمكن تحويرها كي تحقق تغطية للاوراق السفلية والسطوح السفلية لــلاوراق (Topper١٩٨٤، Jones ١٩٩٠) . لقــد خلــص الــى ان تحمــيل الرشاشة المروحية على عجلة او تريسكل بعجلة واحدة مطلوب لتحقيق تغطية متجانسة وجيدة على الاوراق الســفلي: الرشاشــات الظهــرية الالية تحتاج ان تمسك على مستوي منخفض في المحصول ويجب تحويل حامل الرشاشة الظهرية لتحقيق موضع علوي للبشابير في اماكن واطــية من المجموع الخضري. هذا الخيار الاخير هو الاكثر ملائمة بداية لان الرشاشات الظهــرية متاحة ومتوفرة ويمكن ان تستخدم للتطبيق على المحاصيل المختلفة. في القطن فــان اضــافة حــامل التباشير التى طورت في التسعينات في افريقيا الوسطي حسنت من التغطــية الشاملة وربما افضل مما كان متوقعا (Topper ١٩٨٤). التجارب التى اجريت فــي مصر بواسطة معهد بحوث وقاية النباتات بالتعاون مع NRI خلال ١٩٩٠. اوضحت ان هــذه البشــابير ذات الفتحات الاصغر ادت الي تحسين في تغطية الأوراق السفلي كما قللــت من حجوم الرش. النقد الذي يوجه لهذا الاقتراب يتمثل في اية البشابير ذات الفتحات الصغيرة يسهل انسدادها بواسطة الجسيمات التي توجد في الماء المستخدم في الرش.

اختـيار الرشاشة يعتمد على نوع المحصول وتيسر وجودها. في تايلاند فان صنف القطـن النامـي اطول من الصنف المزروع في مصر (حتي ٢ متر بالمقارنة بطول ١,٥ متر في مصر). هذا يعني ان تغطية الاوراق (الاسطح العليا و السفلي) واللوز في قمة النمو الخضري اسهل كثيرا وهذا هو المكان الذي تضع فيه دودة اللوز الشوكية البيض. هـذا يعني امكانية تحقيق فاعلية ومكافحة جيدة دون الحاجة لاستخدام بشابير توجة لاعلى ويكفـي اسـتخدام الرشاشـة الظهـرية الالـية فـي هذا السبيل. في ماليزيا فان مكافحة P.xylostella على الخضراوات تتطلب الاستخدام على الاسطح السفلية للاوراق الخاصة بالمحاصـيل ذات الارتفاع نصف متر. لذلك فان ذراع الرشاشة المزود بواحد او اكثر من البشابير المواجهة لاعلى والتى تم تصنيعها محليا اوفت بكل الاحتياجات والاغراض.

مـن المسـتحيل ان نـتكلم عـن استخدام الرش الكامل دون ان ناخذ في الاعتبار مستحضر المبيد والذي يؤثر على توزيع الرش وحجم القطرات ومسك الرش. مع مادة ما ذات جسـيمات فانهـا لابد وان تؤثر على توزيع الجسيمات كما في حالة بكتريا Bt داخل القطـرة. مـع المـواد الميكروبـية فان منشطات التغذية غالبا ما تضاف للرش مثل مادة COAX الـتى تعـتمد على دقيق بذرة القطن (Young and Yearian, 1986) هذا قد يشـجع التغذية بواسطة الحشرة المستهدفة مثل يرقات دودة اللوز الامريكية الحديثة والتى تحفز على التغذية قبل ان تصل الى لوز القطن. منشطات التغذية الاخري تم تعريفها وهي تبـنى علـى اساس منتجات بسيطة متاحة محليا. مثال ذلك وجبة النجيل grassmeal في الحقل تعمل كمنشط غذائي لدودة ورق القطن (جونز ١٩٩٠).

فـي بعض الحالات و الظروف يؤخذ في الاعتبار بدائل للرش كما في البرسيم فهو محصـول يصـعب تحقيق تغطية جيدة ونفاذية مرضية لمحاليل رش المبيدات، لذلك فان اسـتخدام الطعـوم الصـلبة يمكن ان تؤخذ في الاعتبار . لقد وجد ان وجبة النجيل تجذب يرقات دودة ورق القطن في حقول الليوسيرين في كريت(Campion واخرون ١٩٨٠). لمكافحة دودة اللوز الامريكية في ثنيات اوراق الذرة يكون الخيار الفعال خلط تجهيز جاف من Bt مع مادة حاملة مسحوق خاملة مثل الصلصال. تسقط هذه المساحيق في ثنيات الذرة وهـي المـنطقة التى تتغذي عليها الحشرة . في النهاية يجدر القول ان الفهم الجيد لسلوك الافـة الحشـرية المستهدفة على المحصول يعطي تصور عن أي الافات يمكن مكافحتها بفاعلية باستخدام Bt . مثال ذلك دودة اللوز القرنفلية التى تضع البيض على او بالقرب من بـراعم القطن وبعد فقس البيض مباشرة تتحرك في اللوز مع قليل من التغذية (Pearson، ١٩٥٨). هذا يعني موقع من اصعب ما يمكن لمكافحة الحشرة باستخدام بكتريا Bt ومن ثم

يفضـــل اســـتخدام طـــرق اخري للمكافحة لا تضمن ملامسة الرش او مشاكل التناول مثل الفورمونـــات المخلقـــة. خلاصة القول انه لكي تتحقق فاعلية من بكتريا Bt يجب توجيهها للاماكن المناسبة.

REFERNCES

Abul-Nasr, s. ; moussa, M.A. and Naguib, M.A. (1966). Ecological studies of the cotton leafworm, prodenia litura (fab). I-The egg masses in cotton fields. Bull. Ent. Soc. Egypt, Econ. Ser., 57, 353-360.

Anon. (1991). Gene-engineered cotton in field tests, Ag. Biotech. News and Information, 3 (1), 7-8.

Arnold, A.j. and pye, B.J.(1981). Electrostatic spraying of crops with the APE80. Proceedings 1981 British crop protection conference, pests and Diseases, 661-666.

Campion, D.G.; Ellis, P.E.; Hunter-Jones, P.; Mckinley,D.J.; MeVeigh, L.J.; Murlis, J.; Paton, E.M.; Brimacombe, L.; Bettany, B.W.; Cavanagh, G.G. and Jordon, J. (1980). Pheromones and viruses in the control of the Egyptian cotton leafworm, Spodoptera littoralis (Boisd) and trials with pheromones of the olive moth, prays, prays oleae (Bern,) in crete, report for 1977. COPR unpublished report Natural Resources Institute, chatham, Kent, UK.

Campio, D.G. and Jones, K.A. (1991). Pheromones and microbial insecticides for the control of cotton pests. Proceedings. 50^{th} plenary Meeting of the International cotton Advisory Committee, Antalya, Turkey, September 1991.

Carlton,B.C.; Gawron-Burke, C. and Johnson T.B. (1990). Exploiting the genetic diversity of Bacillus thuringiensis for the ceration of new bioinsecitides. Proceedings Vth International Colloquium on Invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Australia 20-24 August 1990, 18-22.

Coffee,R.A. (1979). Electrodynamic energy – a new approach to pesticide application. Proceedings 1979 British Crop protection conference, pests and Diseases, 777-789.

Falcon,L.A. (1971). Use of bateria for microbial control. In H D Burges & N.W. Hussey (eds) Microbial control of Insects and Miites 67-95. Academic press, London.

Federici,B.A. (1990). Bright horizons for invertebrate pathology. Proceedings Vth International colloquium on Invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Austtraila 20-24 August 1990,5-9.

Gelernter,W.D.(1990). MUPTM bioinsecticide ; abioengineered, bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae. Proceedings Vth international lepidopteran colloquium on invertebrate pathology and Microbial control, Adelaide, Australia 20-24 August 1990-14.

Goodyear, R.(1978). Identification of armyworm, cutworm, budworm and looper caterpillar pests. A.G.Bulletin 2, Department of Agriculture, New south Wales, Astralia.

Heimplel, A.M. and Angus, T.A. (1963). Diseases caued by certain sporeformong bacteria. In E.A. Steinhaus (ed) insect pathology : an advanced Treatise. 2, 12-73 Academic press, London.

Hill. D.S. (1983). Agricultral insect pests of the tropics and their control, 2 nd edition cambridge university press.

Hosny, M.M. (1980). The control of cotton pests in Egypt. Outlook in Agriculture 10. 204-205.

Jones, K.A. (1990). Control of spodoptera littoralis in crete Egypt with NPV. In J.E. casida (ed) pesticides and Alternatives : innovative chemical and Biological Approaches to pest control, 131-142. Elsevier, Amsterdam.

Khalifa, A.; Iss-Hak, R.R. and foda, M.E. (1982). Vertical and horizontal distribution of the Egyptian cotton leafworm masses in cotton fields in Egypt. Research Bulletin No. 1749, faculty of Agriculture, Ain shams university, cairo, Egypt.

Krieg, A.; Huger, A.M.; Langenbruch, G.A. and schnetter, W. (1983) Bacillus thuringiensis. J.Apple. Entom., 96, 500-508.

Mathews, G.A. (1982). Prospects of better deposition deposition of microbial pesticides using electrostatic sprayers. Proceedings IIIrd international colloquium on invertebrate pathology, Brighton UK, september, 1982, 55-59.

Mowlan. M.D. (1973). Spraying cotton with ULV hand machines SPAN, 16 127-128.

Pearson, E.O. (1958). The insect pests of cotton in tropical africa. CAB, London.

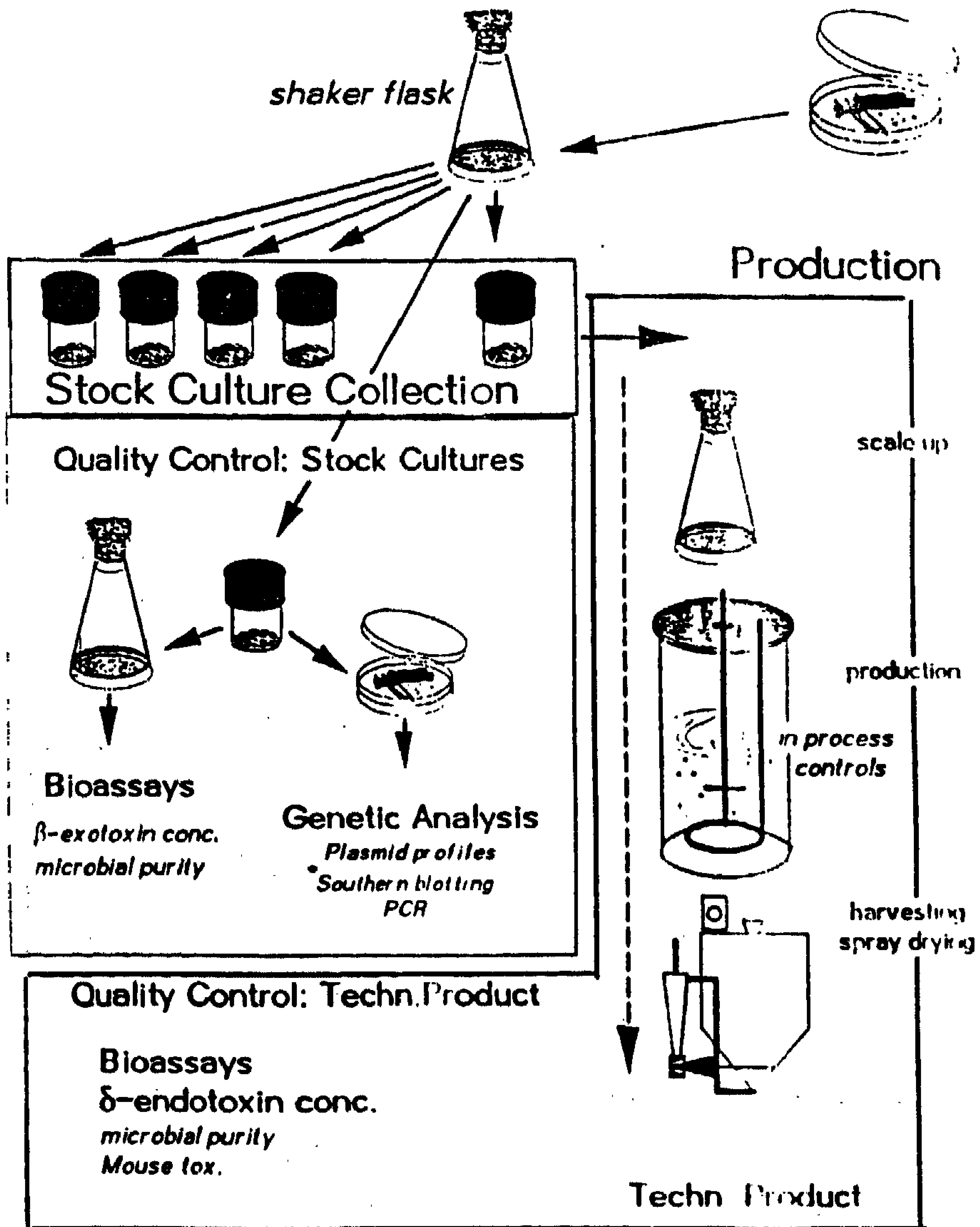
Topper, C.P. (1984). Report on the research and development of nuclear polyhedrosis virus of spodoptera littoralis (Boised.), 1979-1981, 2, ODA, London.

Young III, S.Y. and yearian, W.C. (1986). Formulation and application of baculoviruses vol. II, Practical Application for insect control., 157-179.

٣ـ استخدام الباسيلليس تورينجيسيز في ايطاليا: الوضع الراهن.

مــن مقالــة للباحــث E-pasqualini في معهد الحشرات في "GuidoGrandi" University of Bologna via filippo Re, 6-40126-Bologna, italy. ذكر انه قد سـمح باستخدام Bt في ايطاليا في اوائل ١٩٨٧ بناء على تحضيرات مسجلة فعلا تسمي Bt لتحـت الـنوع كورستاكي (B.T.i) والتى تستخدم على التوالى ضد العديد من أنواع حشـرات حرشـفية وثنائية الأجنحة. قبل وبعد تسجيل هذه المستحضرات تم اجراء العديد مـن الـتجارب ومازالـت تجري تجارب اضافيه على B.t.k. لقد اجريت تجارب حقلية موسـعة لتقييم كفاءة المستحضرات بالمقارنة بالمنتجات الاضافية مثل ازيتوفوس ــ ميثيل والكونـيالفوس. لقـد اجـري عدد من التجارب كذلك على الخضراوات والاشجار لتحديد الجـرعة والتوقيـت المناسبين. لقد أجريت هذه الدراسات في الجامعات والمعاهد البحثية الاخـري مـن خلال برامج عامة استهدفت تحقيق استراتيجيات خاصة للمكافحة المتكاملة والمستنيرة مع هدف تقليل الاعتماد على المبيدات الكيميائية.

بكـتريا.B.t.k مسـجلة في الوقت الراهن كمنتج لمكافحة العديد من انواع حشرات حرشـفية الاجـنحة الضـارة الـتى تصيب التفاح والخوخ والعنب والكرنبو اللفت والذرة واشـجار الغابـات (جـدول ٤-١٢). هـناك توصيات باستخدام هذه البكتريا في حماية المـزراعات الاخـري مـثل الفـراولة والفلفل الاسود والطماطم وغيرها بالرغم من ان التسـجيل الرسمي لهذه الاستخدامات مازالت معلقة. في السنوات الحديثة استخدمت B.t.k بكـثافة فـي مكافحة الاصابات بيرقات (Lep.Arctiidat) Hyfantria التى تهاجم مدي واسـع من اشجار ومحاصيل الفاكهة ونباتات الزينة. لقد اجريت العديد من البحوث لتاكيد الكفـاءة ضـد بعـض انـواع حشرات حرشفية الاجنحة على الكيوي. واشجار المطاط الاسـتهلاك الحـالى مـن بكتريا .B.t.k في ايطاليا بناء على بيانات ١٩٩١ من شركات الكيميائيات وصل حوالى ٣٥-٤٠ طن وزعت على النحو التالي: ٣٥-٤٠% على اشجار الفواكـه، ٥٥-٦٠% على العنب، ٥-٨% على محاصيل الخضر (جدول ٤-١٣) الكمية الـتى اسـتخدمت على اشجار الغابات غير معروفة ولكن يفترض ان تكون قليلة. معظم اسـتهلاك .B.t.k حوالـى ٨٠% يحـدث في المناطق الشمالية من سردينا. توجد انواع .B.t.k مـتاحة في الاسواق الايطالية مثل توروسين HP' باكتوسيين، باكتوسيد ، ديبيل ، بيوبيـت، فوري،....الخ. المبيعات الشاملة وصلت في المتوسط ٢٣ دولار/ كجم للفلاحين وتقـدر باجمـالى ٨٠٠,٠٠٠ دولار تمـثل حوالـى او % من السوق الكلى للمبيدات في ايطاليا.



إختبارات الكشف عن جودة سلالات الباسيلليس ثورنيجنسيز بعد الإنتاج

جدول (٤-١٢) : المحاصيل التى مسجل لمكافحة افاتها بكتريا Bt ضد العديد من الآفات الضـــارة و الجرعات من المواد الفعالة a-I (١٦٠٠٠ وحدة دولية) جم/هكتار

Crops	Main Harmfull species	G /h
Cabbage	Pieris brassicae	30-75
Radish	Pieris rapae	30-75
Mazie	Ostrinia nubilalis	100-150
Apple	Pandemis cerasana	100-150
And	Pandemis heparana	100-150
	Archips podanus	100-150
Pear	Argyrotaenia pulchellana	100-150
	Adoxophyes reticulana	100-150
Vineyard	Lobesia botrana	100-150
	Eupoecilia ambiguella	100-150
forestry	Thaumetopoea pytiocampa	50-100
	Thaumetopoea processionaria	50-100
	Lymantria dispar	50-100

جدول (٤-١٣) : البيانات عن .B.t.k المستخدم في ايطاليا (١٩٩١).

الاستهلاك الكلي	
٣٥-٤٠ طن	← أشجار الفاكهة ٣٥-٤٠%
	← بساتين العنب ٥٥-٦٠%
	← محاصيل أخري ٥-١٠%

لقـد تـم تقسـيم بكتريا B.t.k من ضمن المبيدات مع اقل درجة من السمية ولذلك ليسـت هـناك حاجة لتحديد اقصي حد مسموح به من المخلفات في الغذاء. من اهم ملامح هـذه المنتجات ما يعرف "بفترة التحليل decay period" وهي الفترة التي تنقضي ما بين اخـر معاملة والحصاد وقد قدرت بثلاثة ايام. المركب اختياري لمفصليات الارجل النافعة ولـم تسجيل اية حالات مقاومة حتى الان Resistance في ايطاليا حتي الان (جدول ٤-١٤). الاسـباب الرئيسـية لمحدودية الاستخدام الفعلي تتمثل في : ندرة تحقيق الفاعلية مع درجات الحرارة الواطية، عدم انتظام وثبات وسهولة ازالتها بواسطة الامطار والحاجة في

بعــض الاحيان لاضافه السكر لتحسين للاداء وصعوبة تحديد الوقت المناسب وقصر فترة الفعــل (حوالى اسبوع). السبب الوحيد الذي يسود كل الاسباب في تحديد الاستخدام يحتمل ان يكون عامل التكلفة والذي مازال عاليا حتي الان بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية.

جدول (٤-١٤) : الخصائص الاساسية لتسجيل B.t.k في ايطاليا.

بكتريا B.t.k في القانون	١- أقل قسم في السمية
	٢- لا يوجد مستوي أقصى مسموح به من المخلفات في الغذاء
	٣- فترة التحلل : ٣أيام

تجهــيزات البكــتريا .B.t.i تستخدم لمكافحة الحشرات لاسباب مختلفة بالنظر الى الــبعوض يســتخدم بهدف تقليل ازعاج الحشرات للفلاحين والسائحين كما يستخدم لحماية الحيوانات خاصة ضد حشرات رتبة الهاموش Simulidae . في الوقت الراهن ثم تسجيل العديــد مــن .B.t.i فــي مستحضرات مثل فيكتوباك، تكنار، باكتيس، تورباك، باكتيموس وغــيرها. الاســتهلاك الشــامل للمستحضرات المحتوية على 150 U.IT.I. قدر بحوالى ٢٠٠٠ كجم (بيانات ١٩٩١) استخدام هذه المنتجات يدعم بواسطة الوكالات الحكومية ومن الناحية العملية يقيد استخدامها في شمال شرق ايطاليا وسردينيا.

مازالت تجري العديد من التجارب الحقلية على مستحضرات البكتريا Bt على نطاق واســع ومكــثف للــتفرقة بين المستحضرات المختلفة وتحديد الجرعات الفعالة والتوقيت المناســب للاســتخدام والوصول الي مستحضرات اكثر ثباتا. تجري تجارب واسعة على تحــت انــواع من الباسيلليس مثل Tenebrionis ضد حشرات غمدية الاجنحة. خلاصة القــول انــه يمكن استخدام منتجات لمركبات Bt لمكافحة العديد من الحشرات الضارة مع المحافظة على البيئة وتحسين الفاعلية والاداء وتحقيق الاختيارية. ليكن معاوما ومتفقا عليه ان التوســع في استخدام هذه المستحضرات البكتيرية مرهونا بامكانية تقليل التكاليف ومرة اخــري لــم يذكــر كاتب المقال أي اشارة او معلومة تشير ولو من بعيد عن تاثير بكتريا الباســيلليس بصرف النظر عن تحت النوع على بيض الحشرات فهي سموم معدية لابد ان تؤكل بواسطة الحشرة وتصل الي المعدة حتي تحدث التاثير.......

٤ـ دور وكفاءة الباسيلليس تورينجينسيز في الادارة المتكاملة للافات في الدول النامية.

من مقال للدكتور S.Barbosa خبير الادارة المتكاملة للافات منظمة في الاغذية و الزراعية FAO التابعة للامم المتحدة. لقد تغيرت الزراعة بشكل ملحوظ خلال الاربعين سنة الاخيرة من اجراء تتابع استخدام الكيمائيات المخلقة لمكافحة الافات على المحاصيل المختلفة بداية باكتشاف الددت عام ١٩٣٩ والذي تم الكشف عن فعاليته ضد الحشرات بعد سنوات قليلة من الاكتشاف. من ١٩٤٣ وحتي ١٩٨٥ قفز استهلاك العالم من المبيدات من اقل من ٣٠ ألف طن متري الى ٣ مليون طن متري عام ١٩٨٥ (Prokopy ١٩٨٨). يجب الا ننكر ان المكافحة الكيميائية ساهمت بشكل معنوي في تحقيق زيادة سريعة وثابتة في الانتاج الزراعي حول العالم ولكننا يجب ان نشير الى انها و في نفس الوقت ساهمت بشكل سريع جدا في تقليل صحة النباتات (Brader ١٩٩١) بسبب تتابع الاعتماد المكثف على المكافحة الكيميائية اصبحت الزراعة الحديثة معرضة اجباريا بشكل شديد لاحداث تاثيرات جانبية غير مرغوبة على صحة الانسان والبيئة. لقد قدر مايقرب من ٢٥ مليون عامل زراعي في الدول النامية يتسممون كل عام بالمبيدات (Jeyaratnam ١٩٩٠). من جهة اخري فان تاثير المبيدات على البيئة بالرغم من الحالات الموثقة مازالت تعاني من التقويم الخاطيء. فيما بين مبيدات الافات تعتبر المبيدات الحشرية في اكثر المجموعات اهمية عندما تؤخذ صحة الانسان والبيئة في الاعتبار. من بين الاثني عشر مركب ومايطلق عليها. الدستة القذرة dirty dozen المدونة (pan ١٩٩١) وجدت عشرة منها مبيدات حشرية.

هناك تاثيرين اخرين جانبيين لاستخدام المبيدات يحدثان اكثر مع المبيدات الحشرية. هذه التاثيرات تشمل الفوران الوبائي للاصابة/معاودة ظهور الافة بسبب القضاء على الطفيليات والمفترسات الطبيعية وانتخاب الافات المقاومة لفعل المبيدات. لقد اشار (Georghiou and lagunes١٩٩١) ان من اول الاكتشاف الخطير كظاهرة المقاومة Resistance عام ١٩١٤ وحتى ١٩٨٩ اظهر ٥٠٤ نوع من مفصليات الارجل مقاومة للمجموعات المختلفة من المبيدات الحشرية / مبيدات الاكاروسات ، ٢٨٣ من بينها افات زراعية. تبعا للعالم Luilcox واخرون (١٩٨٦) تم انفاق مايزيد عن ٣ بليون دولار امريكي على مستوي العالم كل سنة لمكافحة الافات الحشرية. من السخرية انه بالرغم من ان استخدام المبيدات على مستوي العالم يزداد دائما فان الفقد الذي تسببه الافات لم يتناقص منذ الحرب العالمية الثانية. حتي في الدول النامية فان صحة النباتات تدهورت. في امريكا على سبيل المثال فان الفقد المحصولى السنوي بسبب الحشرات زاد من ٧% في

الاربعينات الى ١٣% في الثمانينات (Holden ١٩٨٩). الافات الحشرية من رتبة حرشفية الاجنحة تكون المجموعة الاكبر من بين كل الافات الزراعية ومعظمها آفات تظهر بواسطة الاستخدام المكثف لمبيدات الافات. حشرات حرشفية الاجنحة كذلك تتصدر قائمة الانواع الحشرية التى تكون افرادها مقاومة لفعل المبيدات الحشرية من بين كل مفصليات الارجل حيث تمثل ٢٦% من المجموع الكلى (جورجيو ولاجونس ١٩٩١). لحسن الحظ فان بكتريا الباسيلليس تورينجينسيز اكتشفت واظهرت فاعلية ملحوظة ضد هذه المجموعة من الافات الحشرية الزراعية. بالرغم من الكشف عن تطور ظاهرة المقاومة للباسيلليس في ثلاثة انواع من حرشفية الاجنحة وهي فراشة الدقيق الهندية والفراشة ذات الظهر الماسي وفراشة الماس وما احدثه ذلك من احباط في تشجيع وتدعيم استخدام هذه البكتريا في المكافحة الا انها مازالت من افضل الخيارات في العديد من برامج الادارة المتكاملة للافات في المواقع التى تمثل حرشفيات الاجنحة مكانا بارزا بين معقد الافات. في الحقيقة فان مبيعات بكتريا Bt تضاعفت منذ ١٩٨٧ واشارت اكثر التقديرات تحفظا عن حجم السوق ١٩٩٥ ما بين ٣٠٠ مليون دولار و حتي ٥٠٠ مليون دولار(Anon ١٩٩١).

الإدارة المتكاملة للافات (Integrated pest Management (IPM

لجنة خبراء الفاو FAO عن الادارة المتكاملة للافات IPM (والتى كانت تختصر في السابق IPC المكافحة المتكاملة للافات) عرفت IPM كنظام لادارة التعامل مع الافات من مفهوم التواجد البيئي ومجموع الافات باستخدام كل الطرق المناسبة والاساليب في اسلوب متوافق بقدر الامكان والحفاظ علي مجموع الافات عند مستويات اقل من تلك التى تسبب ضرر (FAO ١٩٦٧). الان وبعد ٢٥ سنة من التعريف الرسمي الذي اعلنته FAO عن الادارة المتكاملة للافات IPM فان عدد البرامج الناجحة مازالت قليلة للغاية. بالرغم من التنبية والحيطه التى دعت للحاجة الى تطوير طرق بديلة غير كيميائية لمكافحة الافات في الزراعة الا انه حدثت زيادة مضطردة في استخدام المبيدات في الدول النامية. للإنصاف نقول ان الدول النامية قد فعلت وعضدت القوانين والتشريعات التى استهدفت تقليل استخدام المبيدات في الزراعة بسبب التاثيرات البيئية. من جهة اخري فان دول العالم الثالث في محاولاتها المستميتة والكفاح في سبيل تطوير الزراعة والاقتصاد ليست لديها مقومات حماية البيئة بحيث تضعها في اوائل اولياتها ومن ثم فهي تستخدم أي مبيدات تحصل عليها. لقد ظهر هذا الوضع في العديد من الحالات التى حدثت فيها ثوارت في

بـــرامج تطوير الزراعة التى اضطلعت بمهام تحقيق الثورة الخضراء ووضع النماذج ذات المدخلات العالية في الزراعة.

لحســن الحظ توجد امثله قليلة عن البرامج الناجحة للادراة المتكاملة للافات IPM حيــث امكـــن مـــن خلالها تقليل كميات المبيدات التى كانت تستخدم في السابق وفي نفس الوقـــت الحفاظ على الانتاجية المحصولية العالية. برامج IPM في الارز في اسيا وIPM فـــي فـــول الصويا في امريكا الجنوبية تعطي امثلة جيدة تشجع على عمل الشيء نفسه مع محاصـــيل ومناطق اخري والتى مازالت الزراعة والانتاج الزراعي تعتمد على الكيمائيات فـــي مكافحة الافات. هذين البرنامجين خير دليل على ان IPM هي افضل الاقترابات التى تضـــمن الحفاظ على صحة النبات وبتكاليف قليلة مع تعظيم ما يعرف بالزراعة المستدامة والمتواصلة بما يحافظ على صحة النبات والحفاظ على البيئة.

لكـــي نحقـــق قـــيام الفلاحين انفسهم بممارسة الادارة المتكاملة للافات IPM عمليا نحـــتاج لتسهيل هذه المهمة عليهم. بالطبع فان هذا الاقتراب يحتاج لاساسيات بيئية وتقنية ولكن مع أي مشكلة متعلقة بالافات توجد حزمة كافية من المعلومات تمكن من بدأ برنامج IPM صلب وجيد. كذلك يتم الحصول على معلومات جديدة من البحوث الجارية والمنتهية تصـــلح للتطبـــيق على مستوي الحقل ومن مستوي الحقل ومن ثم تصبح وسيلة جديدة في ممارسات عملية IPM.

معظم برامج IPM الناجحة بدأت كوسيلة للهروب مما يطلق عليه طاحونة المبيدات pesticide treadmill عـــندما تصـــل الـــى حـــدود الخيارات الكيمائية مع كل التتابعات والتاثـــيرات الجانبـــية الـــتى ذكرت اعلاه بالطبع فانه مع المنع الجزئي او الكلي للضغوط بالمبـــيدات مـــن النظام البيئي الزراعي فان الاعداء الطبيعية للافات الحشرية تصبح قادرة علـــى العـــودة وإعـــادة التوازن الذي كان موجوداً بين الافة وبينها فيما قبل الافراط في اســـتخدام المبيدات. من افضل الامثله عن هذه الظاهرة ماحدث في النظام البيئي الزراعي فـــي حقـــول الارز في اسيا. حيث يمثل قافز النباتات العيني Nilaparvata lugens اكثر الافات خطورة واضرارا في برامج تكثيف زراعة الارز بسبب الاستخدام المكثف للمبيدات الحشـــرية. لقد لوحظ ان العناكب تحافظ على اعداد الحشرة وقد كانت المبيدات الحشرية عديمـــة الجدوي ضد الحشرة ولكنها شديدة الفتك وقتل العناكب (Kenmore ١٩٨٠). لقد تـــأكد ان كل الاصابات الوبائية من الحشرة والتى حدثت في اسيا كانت تعود الى استخدام المبيدات واسعة التاثير. هناك حالات كثيرة تحدث فيها انقلاب من حشرات غير ذات اهمية اقتصادية الى افات خطيرة بسبب القضاء على الاعداء الطبيعية

من المعروف الان ان برامج IPM الناجحة لا تختلف في الاساسيات الثلاثة الشائعة فـيها جميعا وهي : نمو نبات صحي ، الحفاظ وصيانة وزيادة الكائنات النافعة التى توجد طبيعيا في النظم البيئية الزراعية ، استخدام المبيدات الاختيارية فقط عند الوصول الى الحد الاقتصـادي للضرر. بالطبع هناك مواقف تحتم التدخل بالمبيدات الحشرية كاحد مدخلات بـرامج IPM . هـذه هـي الحالـة في نمو القطن حيث ان الاصناف تكون حساسة جدا للاصـابة بالحشرات وعندما يكون النظام الشامل معتمدا على المكافحة الكيميائية للافات. فـي هـذه الظـروف فـان المكافحة بالكيميائيات تحت الاشراف الدقيق بناء على الحدود الحـرجة للضـرر قد تصبح الخطوة الهامة في تطوير برنامج IPM . بعض التوصيات العامـة البسـيطة مـثل اتلاف وتحطيم مخلفات النباتات ووضع تواريخ متجانسة للزراعة وتاخـير اول رشة بالمبيدات ما امكن واستخدام المبيدات المتخصصة عند الحاجة قد تكون عصب برنامج IPM على المدي الطويل اذا نفذ بشكل صحيح ومتوافق.

التحديات والعقبات التى تعترض تنفيذ الادارة المتكاملة للافات:

هناك الكثير من التوجهات عن اسباب عدم تحقيق نجاح مع الكثير من برامج IPM او عـدم ادخـال هـذه البرامج بالشكل الكافي الذي كان متوقعا في الدول النامية اخذه في الاعتبار الفوائد الاقتصادية والاجتماعية والبيئية التى اعلن عنها هذا البرنامج منذ ربع قرن مضـي. يمكـن وضع هذه الاسباب في ثلاثة مراتب هي الاقتصادية والاجتماعية والبحثية كما في الاستعراض التالي:

١- **الاسـباب الاقتصادية:** لقد كان الكل حريصا على توفير المبيدات للمزارعيين بتكاليف منخفضـة ومن ثم لايوفر الفلاحين اية مصاريف وتكاليف من خلال توفير عدد مرات اسـتخدام المبـيدات. توجـد صور عديدة للدعم المباشر وغير المباشر للمبيدات وكذلك وضع منح للمبيدات وغيرها من التقنيات التى تزيل اية حوافز لادخال الادارة المتكاملة للافات IPM لجعل الموقف اكثر سوءاً فان المبيدات تسوق وترقي بشكل اقوي من قبل الحكومـات و القطـاع الخـاص حيث الكل يسعي لتحقيق الفوائد. من جهة اخري فان تشـجيع وادخال برامج IPM متروكة للافراد بشكل جيد دون اية مصادر دعم لادخال هـذه الـبرامج. الفلاحيـن لـم يسمعوا عن IPM ولكنهم امام فيضان من الدعاية عن المبيدات.

٢- **الاسـباب الاجتماعـية** : الفلاحيـن في الدول النامية غير منظمين وليس لهم اية قوة سياسـية. لاتسـتخدم الفلاحون في تحقيق مطالب حكومية او في الاتجاه الاخر حيث لا

يضــغط الفلاحين على الحكومة للحصول على مكاسب خاصة بتطوير المناطق الريفية وتحسين ظروف المعيشة. موظفي الحكومة المسئولين عن الخدمات الزراعية والارشاد والــبحوث يحصــلون علــى مرتــبات متدنية ويعيشون في حالة من الثبات او الخنوع العاطفــي كمــا يعانون من نقص او في إمكانيات لا تمكنهم من احداث اية تغييرات في التكنولوجــيا الزراعــية للعملاء، على العكس من ذلك فان بائعي المبيدات يدفعون جيدا ولديهم كل وسائل التحفير لبيع مبيدات اكثر واكثر.

٣- **الاســباب البحثــية:** الجامعــات الزراعية في الدول النامية تعاني من نقص النواحي الاساســية لتجهــيز محــترفون لــتحمل اعــباء المستقبل. البحوث الزراعية والارشاد الزراعــيى تعانــي مــن نقــص الكــوادر الفنية والعلمية وكذلك من نقص الامكانيات والميزانــيات الــتى تمكنهم من تحقيق المهام الموكلة اليهم خاصة مايتعلق بتغيير انماط الزراعة وتحقيق ثبات في السوق الزراعي . هناك تضارب في الاهتمامات عندما يراد ادخال تكنولوجيات حديثة مثل IPM والتى سوف تقلل حتما من مبيعات المبيدات. على المستوي السياسي لايوجد مناخ او بيئة تشجع تطوير برامج IPM .

بالــرغم مــن هــذه الــتحديات فان التاثيرات الجانبية من جراء الاستخدام المكثف للمبــيدات علــى صحة الانسان والبيئة خلقت تحذير وتوجهات للدول النامية تؤكد الحاجة لتطوير برامج IPM كما ذكر سابقا فانه توجد معلومات كثيرة عن الطرق والوسائل البديلة لمكافحــة الافــات علــى مخــتلف المحاصيل في الدول المختلفة. ما نحن في احتياج اليه ضــرورة اشراك الفلاحين من البداية وجعلهم يتمرسون في تطبيق برامج IPM مع قناعة كاملــة لديهم من ان IPM اكثر فائدة وعائدات عن طرق المكافحة الكيميائية ذات الجانب الواحد وجعلها أي IPM اكثر بساطة.

دور الباسيلليس تورينجيسيز في برامج IPM في الدول النامية:

لقــد ســبق القــول ان يرقات الحشرات من رتبة حرشفية الاجنحة تكون مجموعة الافــات الزراعــية الاكثر اهمية. لقد تاكد ان هذه الحشرات عندها حساسية كبيرة لتكوين مقاومــة ضد المبيدات الحشرية ومعاودة الاصابات الوبائية وكذلك تحولها من افات ثانوية الــى افــات رئيسية. الجدول (٤-١٥) يشمل قائمة من الحشرات الهامة من رتبة حرشفية الاجــنحة التى فحصت وتاكد امكانية انً تكون هدف لبكتريا B.t. داخل اطار نظم الادارة المــتكاملة للافات IPM اذا استعرضنا اهم الافات الهامة في الزراعة على مستوي العالم نجــد علــى راس القائمة ديدان اللوز Heliothis Helicoverpa والفراشة ذات الظهر

الماســي (DBM). الاولى معقدة حقيقة حيث تشمل جنسان واربعة انواع في غاية الاهمية كحشرات ملتهمة ولها مدي واسع من المحاصيل التى تهاجمها مثل القطن والذرة. من جهة اخري فان P.xylostella من انواع الحشرات محدودة العوائل مع عدد محدود من العوائل خاصة الصليبيات.

أ- **Helicoverpa/ Heliothis** : لقد اشار جورجيو ولاجونس ١١٨ حالة من المقاومة لفعــل المبيــدات الحشرية في خمسة انواع على مستوي العالم تغطي ستة مجاميع من المبــيدات وهــي الددت، السيكلودنيات، الفوسفورية العضوية، الكاربامات، البيرثربودز المخلقة وغيرها والتى تمثل ٢٠% من كل الحالات المسجلة في رتبة حرشفية الاجنحة. معظــم الحالات المسجلة عن المقاومة داخل هذا المعقد من الافات كان في افات القطن خاصــة ديدان اللوز كذلك فان ظواهر معاودة الاصابة الوبائية وفوران الافات الثانوية جــاءت من حقول القطن. على مستوي العالم فان الاستخدام المكثف للمبيدات في حقول القطــن جعلــت من ديدان اللوز حشرات ذات اهمية خاصة من منطلق نقتطان : **الاولى** جعلهــا افــات رئيسية بعد ان كانت ثانوية كما حدث في امريكا وافريقيا الوسطي حيث ادي الاســتخدام الكثيف للمبيدات الحشرية واسعة الانتشار (توكسافين -ددت ، باراثيون وغــيرها) فــي اول الموسم لمكافحة سوسة اللوز الى ظهور وبائي لديدان اللوز بسبب القضــاء علــى الاعــداء الطبيعــية من طفيليات ومفترسات لقد حدث نفس الموقف في الســوادن فــي اواخــر السبعينات (Eveleens ١٩٨٣) وهو ما يحدث اليوم في اسيا. **النقطة الثانية** ظهور افت رئيسية من الثانوية بعد الاستخدام المكثف للمبيدات في مكافحة ديــدان اللــوز الحديثة الظهور كما سبق القول وهي عملية تدوير او دائرة recycling process . مــن الامور المسلم بها في الوقت الراهن من قبل ولكنها تحولت واصبحت من الافات الخطيرة بعد الاستخدام المكثف للمبيدات الحشرية واسعة الانتشار والمجالات بما فيها البيرثريودز المخلقة قصيرة الاجل.

القطــن معــروف عنه انه البطل الفائز من بين المحاصيل عندما تؤخذ استخدامات المبــيدات فــي الاعتــبار كمعــيار للمقارنة. في بعض الدول النامية وبالنظر الى الاسس الاقتصــادية لانتاج القطن يكون الموقف اكثر خطورة. باكستان على سبيل المثال تستقطع ٨٠% مــن كل استهلاك المبيدات الزراعية في مكافحة افات القطن. المبيدات الحيوية ضد معقــد ديدان اللوز لايبدو انها معقل الحل للمشكلة على المدي الطويل لهذه الافة ولكنها قد تخلصــنا مــن العديــد من المشاكل التى تسببت عن الاستخدام المكثف والواسع للمبيدات الحشــرية . لســوء الحظ فان بكتريا .B.t لم تثبت بالدليل القاطع فاعلية مرضية ضد هذه

المجموعـــة مـــن الافات الحشرية بالرغم من احداثها لنسب موت عالية على الحشرات في الاختبارات المعملية.

لقـــد تم قبول ان اليرقات الصغيرة تقضي وقت قصير جدا في التغذية على اطراف النـــباتات قبل ان تدفن نفسها في اللوز ومن ثم تكون فرصة ان تاكل البللورات و الجراثيم المرشوشـــة فـــي المستحضر محدودة جداً. اذا لم نقوم بحل هذه المشكلة من خلال تجهيز مستحضـــرات افضـــل ووضـــع توقيت مناسب لاستخدام ورش بكتريا Bt او حتي تطوير ســـلالة من Bt اكثر عنفا ضد هذه الافة فان فرص الاستخدام الفعال لمستحضرات Bt في حماية نباتات القطن من هذه الحشرة لاتكون جيدة على الاطلاق. حتي لو نجحنا في التغلب وحـــل كل المشاكل والعقبات والتحديات التي ذكرت قبلا و غيرها فان الفلاحين لن يقوموا باستخدام Bt الا اذا ثبت انها اكثر فاعلية وارخص من المبيدات الاخري.

ب ـ الفراشة ذات الظهر الماسي **Plutella xylostella** : لقد اشار جورجيو ولاجونس (١٩٩١) الى حدوث ١١٠ حالة مقاومة في هذا النوع من الحشرات على مستوي العالم مـــع ســـتة مجاميع من المبيدات الحشرية خاصة معقد ديدان اللوز كما ذكر سابقا. من الاهمية القصوي عن مستقبل Bt في مكافحة هذه الافة ما وجده Tabashnik واخرون (١٩٩٠) و الـــذي اعلـــن من هاواي ولاول مرة انه تكونت سلالات عالية المقاومة من الحشرة DBM ضد المستحضرات التجارية من بكتريا Bt كورستاكي . بعد ذلك اصبح مـــن الواضـــح انه حتي المبيدات الحيوية يجب ان تستخدم بعقلانية حتي نتجنب حالات المقاومـــة وهـــذا يـــنعكس على الحفاظ على وسائل المكافحة فعالة لاطول فترة ممكنة. الفراشـــة ذات الظهـــر الماســـي DBM افـــة عالمية وقد تاكد ان تطور المقاومة ضد المبيدات دفعت الفلاحين لزيادة الجرعات وزيادة عدد الرشات. لقد ادي هذا الوضع الى زيـــادة المقاومـــة اكثر وحدوث مستويات غير مقبولة من مخلفات المبيدات في الكرنب والبروكلي والقرنبيط وغيرها من الصليبيات.

جـــدول (٤-١٥) : افـــات حرشفية الاجنحة الزراعية ذات الاهمية الدولية كاهداف لاستخدامات بكتريا.B.t .

Common Name	Scientific Name	Number of Reported cases of Insecticide Resistance*
Diamondback moth	Plutella xylostella	110
Imported cabbageworm	Pieris rapae	16
Cabbage looper	Trichoplusia ni	46
Lesser armworm	Spodoptera exigua	14
Cabbage webworm	Hellual undalis	-
Latin American	Ascia monuste orseis	-
cabbageworm	Crocidolomia binotalis	-
Cabbage moth		
COTTON	Helicoverpa armigera	30
American bollworm	Helicoverpa zea	35
Cotton bollworm	Heliothis virescens	52
Tobacco budworm	Earias insulana	-
Spotted bollworm	Pectinophora gossypiella	4
Spiny bollworm	Diparopsis castanea	4
Pink bollworm	Alabama argillacea	-
Red bollworm	Spodoptera littoralis	9
Cotton leafworm	S. exigua	33
Cotton leafworm	S. frugiperda	14
Lesser armworm	S. Litura	14
Black armyworm	Agrotis ipsilon	9
Fall armworm	A.segetum	6
Black cutworm	Bucculatrix thurberiella	-
Cotton leaf perforator		20
FRUITS		
Codling moth (apples)	Cydia pomonella	39
Grape moth	Lobesia botrana	1
Oriental fruit moth	Grapholota molesta	3
GRAIN LEGUMES		
Velvetbean caterpillar	Anticarsia gemmatalis	-
Soybean lopper	Pseudoplusia includens	6
American bollworm	Helicoverpa armigera	30
Bean pod borer (Mung moth)	Maruca testulalis	-

تـابع جـدول (٤-١٥) : افـات حرشـفية الاجـنحة الزراعـية ذات الاهمية الدولية كاهداف لاستخدامات بكتريا B.t. .

JUTE AND KENAF	Anomis sabulifera	-
Jute semilooper	Diacrisia obliqua	-
Jute hairy caterpillar	spodoptera exigua	
Indigo caterpillar		
		-
MAIZE	Spodotera exempta	14
African armworm	S. frugiperda	-
Black armworm	Ostrinia nubilalis	2
European cornborer	O. furnacalis	-
Asiatic cornborer	Chilo partellus	-
Spotted stalk	Busseola fusca	-
Maize stalk borer	Helicoverpa zea	35
Corn armworm	H. armigera	30
American bollworm	Sesamia calamistis	
Pink stalk borer		
RICE		
Rice stem borer	Chilo suppressalis	-
Rice leaf folder	Cnaphalocrocis medinalis	13
Small rice borer	Scirpophage gilviberbis	1
White rice borer	S. nivella	-
Yellow rice borer	Tryporiza incertulas	-
		-
TOMATOES		
(and other solanceae)		
Tomato fruitworm	Helicoverpa zea	35
American bollworm	H. armigera	30
Lesser armworm	Spodoptera exigua	14
Tomato pinworm	Keiferia lycopersicella	-
Tomato leafminer	Scrobipalpula absoluta	1
Brinjal borer South	Leucinnodes orbonalis	-
American fruitworm	Neoleucindes elegantalis	-
Potato tubermoth	Phithorimaea operculella	11

*From Georghiou and Lagunes. 1991

لقـــد أظهـــر استخدام مستحضرات .B.t في مكافحة يرقات DBM فاعلية جيدة في كثـــير من الاماكن التى استخدمت فيها ومازالت تعطي المثل عن الجدوي الحقيقة للاعتماد علـــى المبيدات الميكروبية في مكافحة الافات الزراعية. البكتريا تقتل الافة ولكنها لا تضر بـــالاعداء الطبيعـــية او تطردها ولا تحدث اية اخطار على عمال الرش ولا تترك مخلفات ســـامة علـــى المنتجات الزراعية كما لا تضر بالبيئة. لسوء الحظ فان المبيدات الميكروبية عالـــية التكلفة بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية. التقدير الحديث عن مقاومة DBM قد يكـــون بمـــثابة وقاية من الاندفاع نحو زيادة جرعات وعدد مرات استخدام المبيدات تجنبا لزيادة التكاليف واضطراد تطور المقاومة.

ج ــ افات اخري من رتبة حرشفية الاجنحة: كما ذكر قبلا يوجد العديد من انواع حشرات حرشـــفية الاجـــنحة تســـتجيب لبكـــتريا Bt في الصين كمثال فان المستحضرات المحلية للباســـيلليس Bt تســـتخدم بانتظام ضد افات الاوراق c.medinalis عندما يصل المجموع الـــى مســـتوي الحد الحرج للضرر في البرازيل اظهرت مستحضرات Bt نتائج جيدة ضد دودة ورق القطن ولكن الحاجة لاستخدام مبيدات اخري جنبا الى جنب مع Bt في الحالات التى لا يكفي فيها الاعتماد على Bt منعت الفلاحين من التركيز والاعتماد على الباسيلليس . بالطـــبع فـــان تعظـــيم ادخال Bt في مكافحة الافات يتطلب استثمارات ضخمة وبحوث وتطويـــر وتحقيق ظروف مناسبة في محاصيل معينة قبل الوصول لنجاحات بارزة في هذا الشأن.

REFERENCES

Adkisson, P.L. (1972) the integrated control of the insect pests of cotton. Proc. Tall timbers conf. On Ecological Animal control by Habitat Management, tall Timbers Res. Sta. (Tallahasse, FL) 4,175-188.

Anon. (1991). Pesticide News. 12 the pesticides trust & pesticides News. London, p. 16.

Barader, L. (1991) Global trends and constraints of integrated pest Management. Paper presented at the XII International plant protection congress. Rio de Janeiro. Brazil. 11-16 August 1991.

Eveleens, K.G. (1983). Cotton insect control in the sudan Ghezira : analysis of a crisis. Crop protectioon . 2(3) 273-287.

FAO (1967). Report of the first session of the FAO panel of Experts on integrated pest control. Rome. 19 pp.

Georghiou, G.P. and lagunes, A.T. (1991). The occurrence of Resistance to pesticides in Arthropods. FAO. AGPP/MISC 91-1. 318 PP.

Holden, c. (1989). Research news : entomologists wane as Insect wax. Science, 246, 754-757.

Jeyaratnam, J. (1990). Acute pesticide poisoning : A major problem. World Health stat. Ort. 43, 139-144.

Kenmore, P.E. (1980). Ecology and outbreaks of a tropical insect pest of the green revolution : the rice brown planthopper, Nilapavata lugens (stal). Ph. D. thesis, university of california, Berkeley (USA).

Lim, G.S. (1990) Overview of vegetable IPM in Asia. FAO plant protection Bulletin 38 (2), 73-87.

McGaughey, W.R. (1985). Insect resistance to the biological insecticide Bacillus thuringiensis. Science, 229, 193-195.

McGaughey, W.R. and Beeman, R.W. (1988). Resistance to Bacillus thuringiensis in colonies of indianmeal moth and Almond moth (Lepidoptera : pyralidae). J.Econ. Entomol. 81, 28-33.

Prokopy, R.J. (1988). Pest management in perspective. In innovations in pest Management. Stubridge, Mass., March 7-8, p. 7-11.

Tabashnik, B.E. ; Cushing, N.l. ; fison N. and Johnson, M.V. (1990).Field development of resistance to Bacikkus thuringiensis in the diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83, 1671-1676.

Wilcox, D.R. ; Shivakumar, A.G. ; Melin, B.E. ; Miller, M.f. ; Beson, T.A. ; Shopp, C.W. ; Casuto, D. ; Gundling, G.J. ; Bolling, T.J. ; Spear B.B. and Fox, j.l. (1986). Genetic Engineering of Bioinsecticides. In M. Inouye & R. Sarma (eds). Protein Engineering : Applications in science, Medicine and Industry. Academic, Orlando, Flo, 395-413.

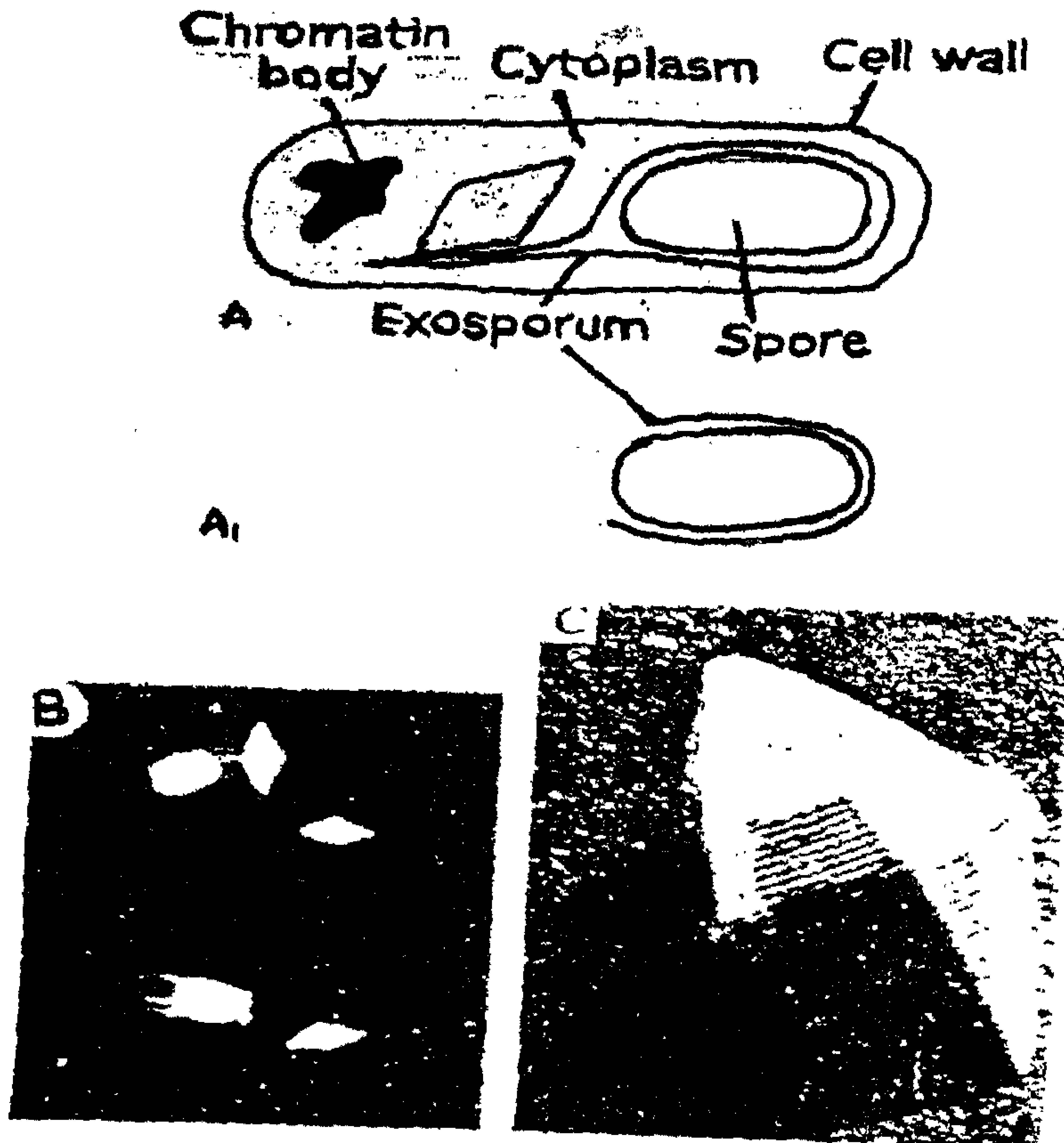
٥ـ ثبات الباسيلليس تورينجينسيز في البيئات الاستوائية

مـن مقالة للدكتور O.N. Morris من محطة البحوث الزراعية بمانيتوبا ـ كندا. لقد قدم الدكتور موريس بالقول بان الفقد السريع للنشاط للمرضات الحشرية بواسطة ضوء الشمس لوحظ على مستوي العالم؟. لقد ثبت ان ضوء الشمس يحدد الفاعلية الباقية والكفاءة فـي الحقـل . هذا العامل يعتبر محدد اذا كانت الحشرة المستهدفة تقضي وقتا طويلا من تغذيـتها فـي اماكن محمية او اذا كان الممرض ينتقل للاجيال التالية عن طريق الاوراق الملوثـة كمـا فـي فـيروس البولى هيدروزيس السيتوبلازمي. الموجات الضوئية القاتلة للجراثيم من الشمس والتى تصل الى سطح الارض تتراوح من ٢٩٠ وحتي ٣٩٠ نانوميتر وتكـون حوالـى ٧% مـن الضوء الكلى للشمس على مستوي الارض. من المعروف ان الجراثـيم البكتـيرية تمتص كلا الاشعة فوق البنفسجية (٣٣٠ نانوميتر) والضوء المرئي (قريـبا مـن ٤٠٠ نانوميتر). البللورات الذائبة للباسيليس تورينجينسيز (Bt) تمتص ٢٧٣ نانوميـتر ولكن القليل من هذه الموجات (=٢%) تصل سطح الارض. بالرغم من ان نسبة الاشعاع الشمسي القاتلة للميكروبات والساقطة على الارض صغيرة الا انها قد تبدو فعالة في هدم وتدهور .B.t في الطبيعة ومن ثم تحدد فاعليتها في مكافحة الحشرات. هذا يحدث فـي البيئات الاستوائية على وجه الخصوص حيث الظروف البيئية السائدة سوف تكون في متـناول الكائـنات الدقـيقة. لقـد لوحـظ ان الحرارة والرطوبة النسبية وسطح الورقة واخـراجاته تسبب هدم وفقد في النشاط الميكروبى سواء كل على حدة او مع اشعة الشمس مشاركة.

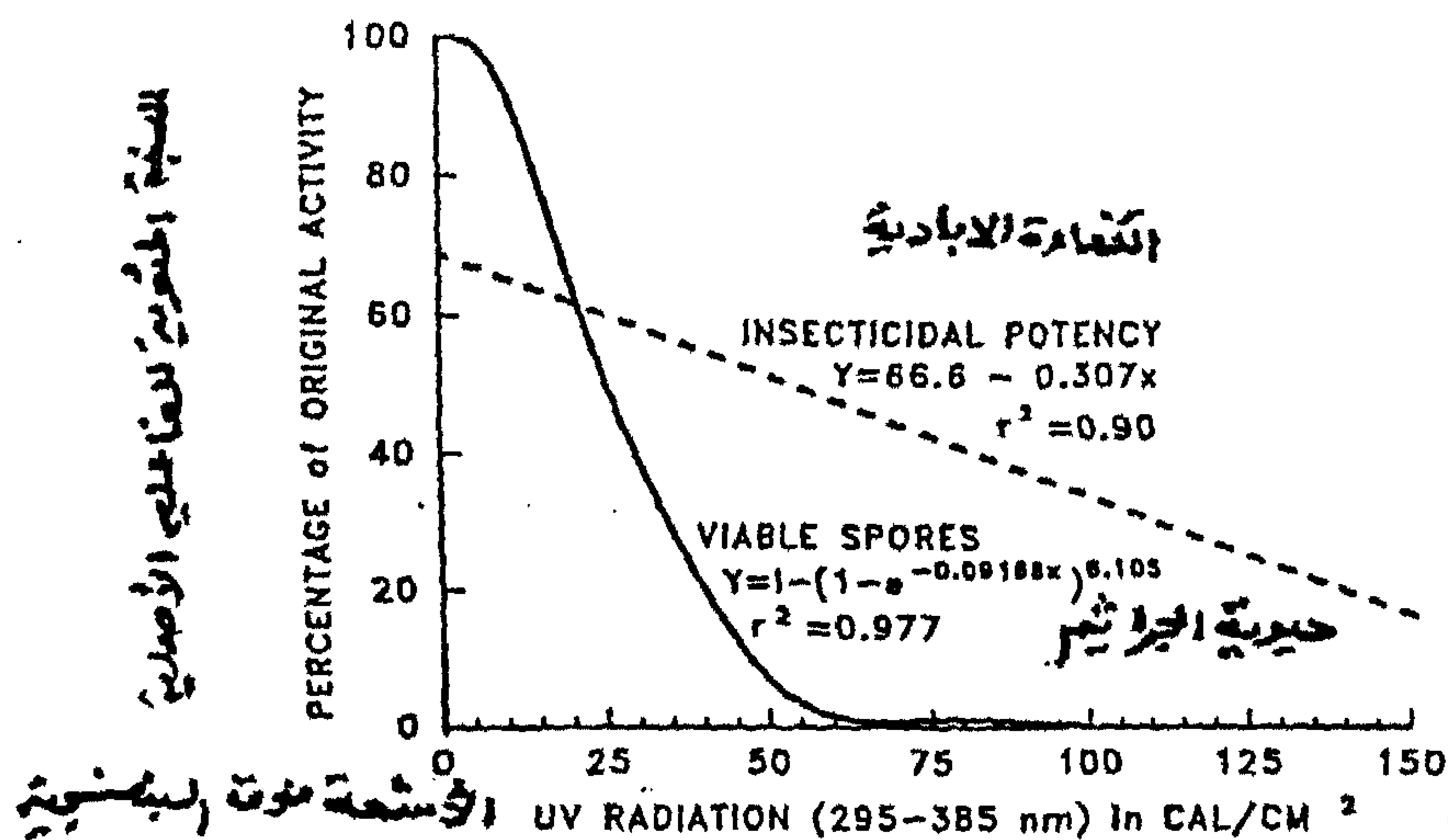
فـي هذا المقام سوف نقوم باستعراض بعض النظريات عن كيفية احداث الفعل في الهـدم بالضـوء للباسـيلليس تورينجينسيز وثبات البكتريا في البيئات المعتدلة والاستوائية وطـرق اطالـة النشـاط الباقي الفعال لبكتريا Bt في الزراعات والغابات. الشكل (٤-١) يوضـح جراثيم وبلورات الاندوتوكسين والفحص الالكتروني للدلتا ـ اندوتوكسين التى تم تصـويرها بالـ electron micrographs الشكل (٤-٢) يوضح الخفض في كلا حيوية الجراثـيم والكفـاءة الابادية ضد الحشرات مع زيادة فترة التعرض للاشعة فوق البنفسجية حيـث حـدث خفـض معنوي كبير في حيوية الجراثيم بدرجة اسرع مما حدث في نقص الكفاءة الابادية على الحشرة (Morris ١٩٨٣). لقد فقدت الجراثيم ٥٠% من فعاليتها بعد ٢٦ كـالوري/سم٢ من ضوء الشمس بالمقارنة ٦٠ كالوري/سم٢ لبلورات الاندوتوكسين. لقـد ادت البيانات الى الاقتراح بانه اذا كانت الجراثيم تساهم في الفعل الابادي فانها تحقق

ذلـك فقـط خـلال فترات التعريض الاولى لاشعة الشمس. الشكل (٤-٣) يوضح طيف الانعكاس لجراثيم Bt.

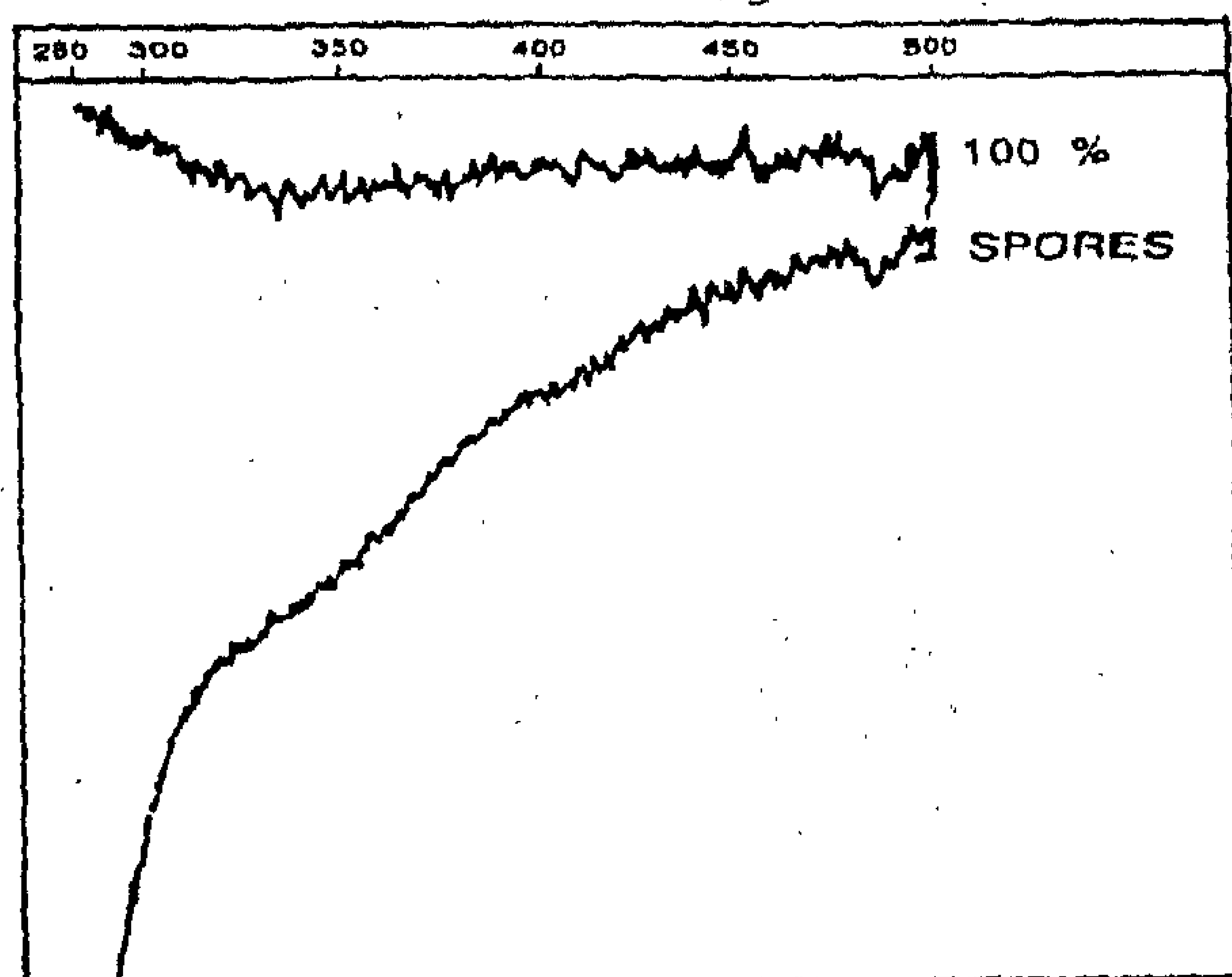
فـي الضـوء متعدد الالوان باستخدام نموذج كاري الاسبكتروفوتومتري. هذا يحدد انعكـاس المعلـق النقي لجراثيم Bt على غشاء راشح ميلليبور باستخدام الاضاءة متعددة الالوان والاضاءة وحيدة اللون والتى اظهرت قمة امتصاص بين ٢٨٠-٣٢٠ نانوميتر مع نقص الامتصاص بين ٣٢٠ وحتي ٥٠٠ نانوميتر. عدم تماثل المنحني عند اعلى من ٣٢٠ نانوميتر قد يرجع الى التوزيع غير المتجانس للجراثيم على ورق الترشيح.



شـكل (٤-١): رسم توضيحي لخلية الباسيلليس ثورينجينيسيز يوضح الجراثيم وبلورات جسيمات الاندوتوكسين.

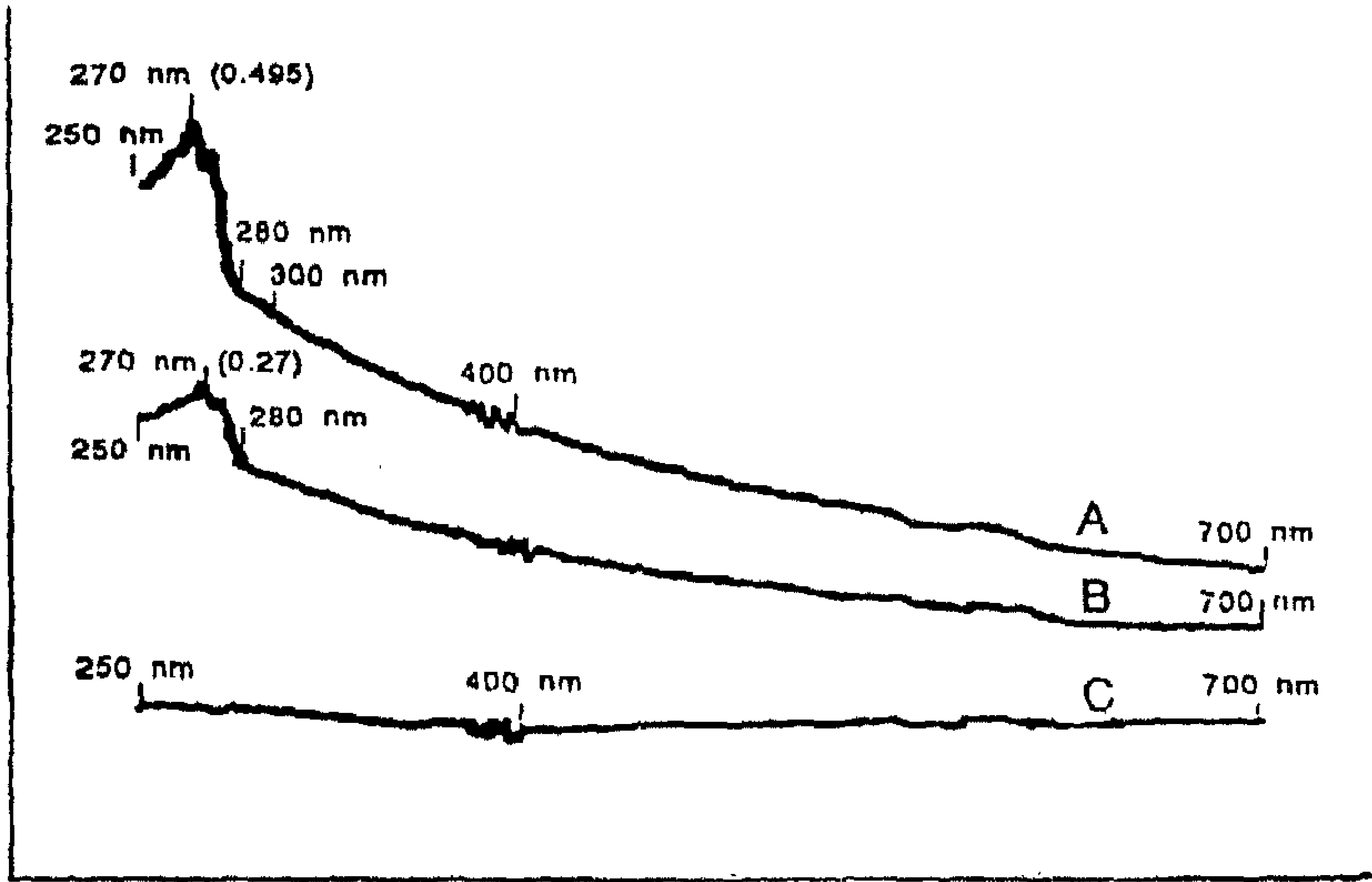


شكل (٤-٢): منحنيات التدهور في سمية الجراثيم/بلورات للباسيلليس ثورينجينيسيز من الصنف ثورستاكي بعد التعرض لأشعة الشمس في أوتاوا_ كندا.



شكل (٤-٣): انعكاس طيف جراثيم الباسيلليس تورينجسيز في الضوء متعدد الالوان

الشكل (٤-٤): يوضح قمم الامتصاص الطيفي للجراثيم النقية في المطلق. يوجد امتصاص معنوي بين ٢٥٠ نانوميتر و ٤٠٠ نانوميتر بقمة عند ٢٧٠ نانوميتر لقد تم القياس على سبكتروفوتومتر بيكمان اكتاسي ٣ باستخدام مدي الكشف ٢٥٠-٧٠٠ نانوميتر.



شكل (٤-٤): قمم الامتصاص الطيفي للجراثيم الباسيلليس تورينجسيز

لقد تكونت قناعة لدي كاتب المقال ان الاطوال الموجبة القاتلة للجراثيم في بكتريا Bt تكون في السنهاية الدنيا بالقرب من الاشعة فوق البنفسجية والتى تتراوح من ٢٨٠ وحتي ٣٤٠ نانوميتر. هذا ولو ان الباحثان Griego and spence قدما دليل على ان هدم Bt بواسطة اشعة الشمس ترجع في جزء منها الى الأطوال الموجية القريبة من ٤٠٠ نانوميتر والتى تقوم الجراثيم بامتصاصها بسهولة.

كيفية احداث فعل الاشعة فوق البنفسجية على بكتريا الباسيلليس Bt.

هناك اتفاق عام مفادة ان اشعة الشمس تهدم وتفقد جراثيم وبللورات بكتريا Bt فعاليتها ومن هنا يتبادر الى الاذهان سؤال يقول ويسال عن التقنية او الميكانيكية التى تحدث من خلالها هذا التاثير. هناك نظريات عديدة ولكن لا يوجد اتفاق عام. في البداية قيل انه اذا كانت الاطوال الموجية الابادية للجراثيم تقع بين ٢٨٠ وحتي ٣٨٠ نانوميتر فان هذا يعضد حقيقة ان الاحماض النووية والبروتينات معروف عنها انها تفقد طبيعتها عند التعرض للاشعة فوق البنفسجية اقل من ٣٤٠ نانوميتر (Jagger ١٩٦٧). اذا امكن تحديد الميكانيكية الواقعية التي تؤدي الى فقد سمية البروتين وخروجه عن طبيعته فانه يمكن وضع اساس عقلاني لهندسة التوكسين. لقد اعتبر دكتور H.Kaplan بالمركز

القومـــي للــبحوث في اوتاوا-كندا بانه من غير الطبيعي ان يتاثر البروتين بواسطة ضوء الشمس. لقد اكتشف الباحث وجود شوائب في بللورات البروتين وعندما يصل الضوء اليها فان هذه الشوائب تنشط الطاقة في الاوكسجين او تنشط الاكسجين بالطاقة وفي الناحية التى تهـاجم البروتيـن وتجعلــه غــير فعال. لقد اشار د. كابلان انه في خلال ٨ ساعات فان التوكســين الاولــى لبكتريا .B.t تفقد نصف سميته وفي جزء من هذا التاثير فان الاشعاع بضوء الشمس لبلورات الباسيلليس يعيدها غير ذائبة مرة اخري.

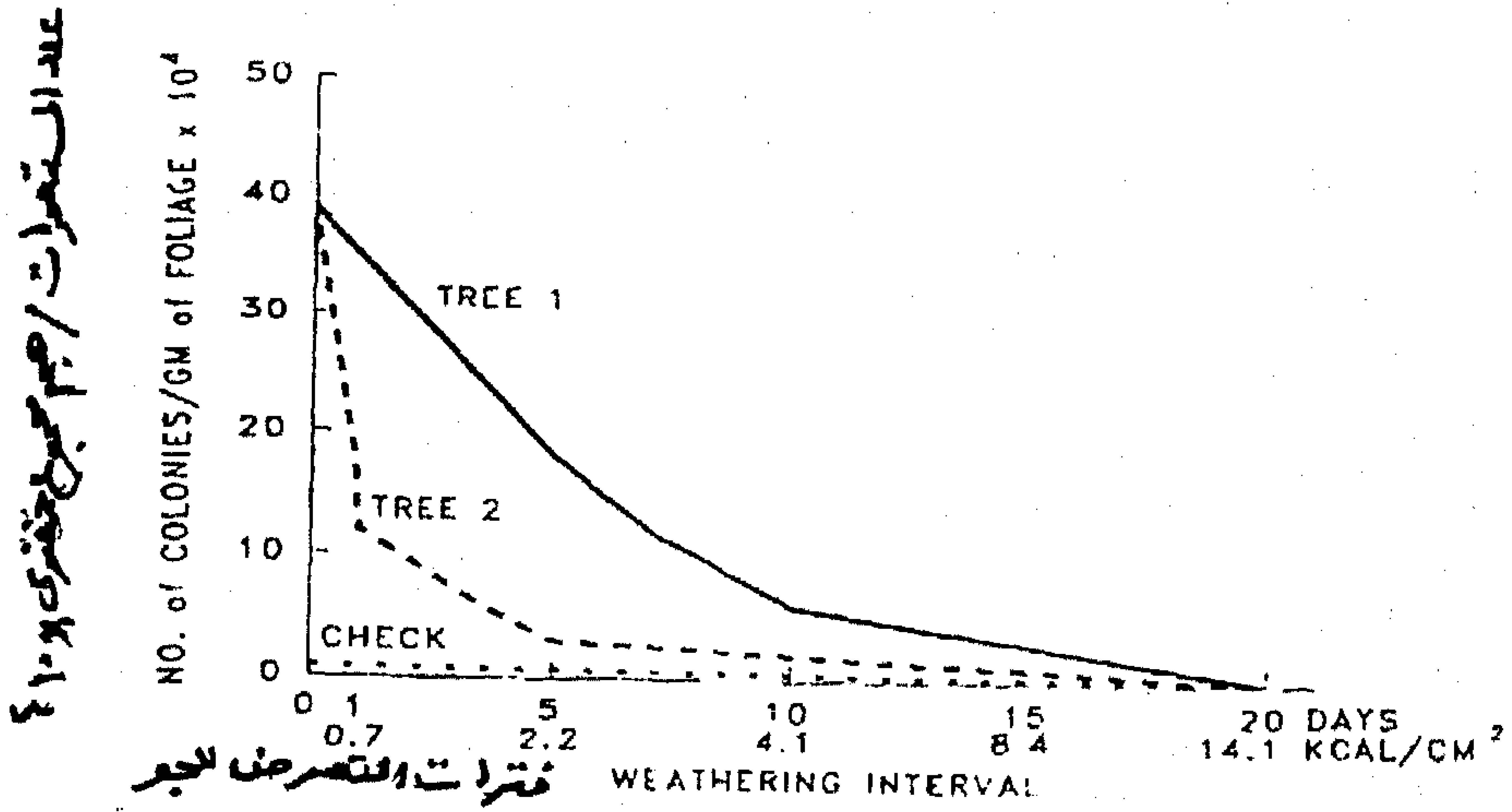
لقــد اعطـــي Poz.sgay وأخـــرون (١٩٨٧) ادلة جيدة تفيد بان الحمض الاميني ترتــبوفان يتحطم في البللورات المعرضة لاشعة الشمس ومن ثم يفقد المستحضر فعاليته. لقد اشار الباحثان كابوشينسكي وميتشيل (١٩٨١) ان اشعة الشمس تحطم نظام الكتاليز في البكتريا ايشيريشياكولاي. يمكن اصلاح هذا الضرر او تفادية عن طريق اضافه الكتاليز او البــيروفات الى البيئة او المزرعة. لقد اظهرت احدث دراسة اجراها كابلان ومعاونوه ان طــيف الاشعة الشمسية باطوال ٣٠٠-٣٥٠ نانوميتر تكون مسئولة بشكل كبير عن تحطيم الــبللورات المعرضة لسائل التخمر وتجعل البللورات حساسة للضوء. هذه فكرة في غاية الاثارة لانها ادت الى الاقتراح بضرورة المناورة بوسط المزرعة للحفاظ على البكتريا Bt اقل حساسية لضوء الشمس. في الحقيقة فان الباحث ساندرز في كندا اقترح في عام ١٩٧٤ ان جراثــيم .B.t الــتى تــتغذي جيدا تكون اكثر مقاومة للاشعاع عما هو الحال مع غير المغذاة جيداً.

ثــبات بكـــتريا .B.t فـــي البيـــئة persistence: الثبات القليل لبكتريا .B.t على الــزراعات بعــد التعرض لاشعة الشمس المباشرة تاكد مرات عديدة. الفاعلية ذات الاثر الباقــي على المحاصيل يبدو انها ترتبط باكثر من مجرد التعرض للاشعة فوق البنفسيجية. لقد اشار موريس ومور (١٩٧٥) كمثال ان بكتريا Bt التى استخدمت على اشجار البيسية فقــدت ٥٠% من الفعل الابادي في ٨ أيام في الظل بالمقارنة بفقد ٥٠% خلال يومان فقط مــع الــتعرض لضـــوء الشـــمس. الفاعلية ذات الاثر الباقي موضحة في جدول (٤-١٦) والشـــكل (٤-٥) . البــيانات الموجودة في الشكل توضح حدوث خفض معنوي في حيوية الجراثــيم (Morris ١٩٧٧) بعــد يــوم واحد من التعريض للظروف المناخية في كندا. اظهــرت بــيانات اختــبارات التقيــيم الحيوي على نفس الاشجار مستوي عالى من الفعل البيولوجـــي مـــع اســـتمرار الفاعلية حتي ٢٠ يوم بسبب البللورات. تحت الظروف تحت الاســـتوائية فـــي الولايات المتحدة الامريكية تراوح الفعل الابادي لبكتريا Bt على نباتات القطن ما بين ٣٠ حتي ٤٨ ساعة (Beegle واخرون ١٩٨١).

جـدول (٤-١٦) : نصـف فـترة الحياة المقدرة لبعض الممرضات الحشرية مع ضوء الشمس الطبيعي في شمال امريكا.

Pathogen الممرض	Half-life (Hrs) نصف فترة الحياة (ساعة)
Nosema trichoplusiae	8
Heliothis NPV	24
Trichoplusia NPV	48
Pieriis GV	42
Bacillus thuringiensis	
Spores	24
Crystals	72
Metarrhizum anisopliae	8
Nomuraea rileyi	60
Nosema necatrix	1

لقـد تراوحـت نصف فترة الحياة تحت الظروف المصرية على نباتات الخروع ما بين ١٩ حتي ٤٠ ساعة (Ragaei ١٩٩٥) . لقد اشار حامد وحسانين (١٩٨٦) في مصر انه بعد ٦ أيام من التعرض لضوء الشمس احدثت اوراق القطن المعاملة ببكتريا Bt قتل ٧ % فـي يرقات دودة ورق القطن بالمقارنة بنسبة ٢٧% على اوراق القطن الموضوعة في الظل.



شـكل (٤-٥) : منحنيـات انهيار الجراثيم في بكتريا Bt من الصنف كورستاكي عندما استخدمت بالرش الجوي لاشجار البيسية في اونتاريو-كندا

اطالـة الفعـل الباقي للباسيلليس تورينجينسيز: لقد اجريت محاولات عديدة في السنوات الاخيرة لاطالة فترة حياة بكتريا .B.t المعرضة للاشعة فوق البنفسيجية من ضوء الشمس. في عام ١٩٨٣ اوصي Morris ان أي مواد امتصاص لهذه الاشعة UV absorbers مع Bt يجـب ان يكـون لها قدرات امتصاص عالية في مدي الاطوال الموجية ٣٣٠-٤٠٠ نانوميـتر. الجـدول (٤-١٧) يلخص هذه المحاولات لقد قام موريس (١٩٨٣) باستخدام الصبغات التي تذوب في الماء مثل DS-49

(Sodium2.2-dihydroxy-4-4dimethoxy-5-sulfobenzophenone sodium salt of formyl-m-benzene) Erio Acid x Bloo disulphonic acid

و الصـبغة (disulphonic acid. هذا المخلوط مع قمم اطوال موجية ٨٤، ٣٣٠، ٥٠٤ نانوميـتر زادت مـن النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt على اشجار البيسية البيضاء بمقدار ٢,٩ مرة . لقد زاد محلول ٢% من الكونغو رد النشاط الفعال على نباتات الخروع بمقدار ٣,٣ مرة في مصر (راجي، ١٩٩٠) لقد اشار دنكلوشاشا (١٩٨٩) ان بكتريا Bt المكبسلة مـع النشا مع ١% تونجو رد احتفظت بحوالى ٥٠% على الاقل من نشاطها الاصلي بعد ١٢ يومـا مـن التعرض لضوء الشمس (٥٠% من الفاعلية الاصلية دون التعرض لضوء الشـمس تسـاوي ٢ يوم). حامض الفوليك وحامض البارا-امينو بنزويك كمصفاة لضوء

الشـــمس كانـــت اقل فاعلية. لقد اشار كوهين واخرون (١٩٩٠) ان حماية بكتريا Bt من الضـــوء عن طريق امتصاص الكروموسفورات الكاتيونية مثل اكريفلافين و الرودواين B. بعـــد ١٢ ساعة من التعرض للاشعة فوق البنفسجية وصلت نسبة الموت حوالى ٧٨% مع الاكريفلافيـــن بالمقارنـــة بموت ٥% بدون الاكريفلافين. هذا الاقتراب يتضمن امتصاص جوهـــري كبير بين المبيد العضوي والمادة الحساسة للضوء المختارة chromophore. هذا الترتيب الفراغي يسهل نقل الطاقة او الالكترونات بين الجزيء المثار والكروموسفور. في هذا السبيل فان التفاعلات الضوء كيميائية تمنع جزئيا او كليا.

جـــدول (٤-١٧) : طـــرق إطالة النشاط الباقي الفعال لبكتريا Bt المعرضة للاشعة فوق البنفسجية.

Technique الطريقة	Substate الوسيط	conuntry البلد	Reference المرجع
1% DS49+1% EAR	Balsam Fir	Canada	Morris, 1983
2% Congo Red	Castor	Egypt	Ragaei, 1990
Starch-encapsulated + 1% Congo Red	Starch granules	USA	Dunkjle,& shasha, 1989
Acriflavin	Artificial diet	Israel	Cohen et al.,
M-CAP (Mycogen)	?	USA	1990 Mycogen, 1986

طـــريقة الكبسولاتM-CAP (Mycogen) تتضمن كبسلة الدلتا-اندوتوكسين داخل خلايـــا ميـــتة وثابتة للبسيدوموناس فلوريسينس و هي بكتريا تكون مستعمرات في جذور الـــذرة. يعـــتقد كاتـــب المقال ان هذه الطريقة المهندسة وراثيا لزيادة الفاعلية الباقية تحت الاحـــتكار فـــي الولايات المتحدة الامريكية في الوقت الراهن وان المستحضر في طريقة للعـــرض في الاسواق. البيانات الموجودة في الجدول (٤-١٨) توضـح ان المواد congo Red ,Orzan والمـــولاس تســـتطيع حمايـــة Bt من الهدم السريع وفقد الفاعلية من جراء الـــتعرض لضـــوء الشمس بعد المعاملة على نباتات الخروع. يوضـح جدول (٤-١٩) ان الكونجـــورد لـــم يكن فعالا في حماية Bt على نباتات الكانولا بناء على نسب موت حشرة الـــدودة القارضة. هذا بالرغم من ان تصفية ضوء الشمس ذات فاعلية واضحة في خفض نشاط التغذية ليرقات الدودة.

جـــدول (٤-١٨) : الفاعلـــية النسبية لبعض المواد الماصة لاشعة UV لبكتريا Bt تحت الظروف البيئية المصرية.

Relative Efficiency الفاعلية النسبية		
UV Absorber المواد الماصة للاشعة	Artifical UV source المصدر الصناعي للاشعة	Sunlight castor plants ضوء الشمس على الخروع
B.t alone exposed	1.0	1.0
B.t. + 10% Orzan	2.2	5.6
B.t. +25% Molasses	2.4	3.7
B.t. + 2% Congo	2.1	3.3

جدول (٤-١٩) : الموت ونشاط التغذية لحشرة M.Coofigurata على نباتات الكانولا المعاملة ببكتريا Bt مع التعريض لمصفاة امتصاص الاشعة.

Treatment المعاملة	Mortality (%) الموت %	Mean Wt. Gain of Surviviors (MG ± SD.) الوزن المكتسب
B.t. without Congo Red-Shade	93	32±19
B.t. without Congo Red-sun	22	22±15
B.t. with Congo Red-sun	22	0±0

فـــي النهاية اقترح الباحث انه في البيئات الاستوائية فان الطريقة البسيطة نسبيا التى تتمـــثل في اضـافه صبغة الكونجورد المذابة في الماء مع ٢٥% مولاس تعتبر وسيلة فعالة وعملـــية في طريقة اطالة فاعلية بكتريا Bt المستخدمة على المحاصيل . من المحتمل الا ننصـــح باستخدام هذه الصبغة على نطاق واسع في هذا الوقت حيث لم تتحقق القبول البيئي الكامل لهذا الاقتراب بعد.

REFERENCES

Beegle, C.C. ; Dulmlage, H.T. ; Wolfersberger, H.D. and Martinez, E. (1981).
Persistance of Bacillus thuringiensis Berliner insecticidal activity on cotton foliage. Env. Entomol. 10, 400-401.

Cohen, E. ; Rozen, H. ; Joseph, T. ; Braun, S and Marguiles, L.(1990).
Photoprotection of Bacillus thuringiensis kurstaki from ultraviolet radiation. J. Inverteber. Pathol. 57, 343-351.

Dunkle, R.L. and shasha, B.S. (1989). Response of starch-encapsulated Bacillus thuringiensis containing ultraviolet screens to sunlight. Environ. Entomol. 18, 1036-1041.

Griego, V.M. and spence. K.D. (1978). Inactivation of Bacillus thuringiensis spores by ultraviolet and visible light. Appl. Environ. Microbiol. 35, 906-910.

Jagger, J. (1967). Introduction to research in ultraviolet photobiology. Prentice Hall, N.J. 146 pp.

Hamed, A.R. and Hassanein. F.A. (1986). Persistance and virulence of Bacillus thuringiensis under sunny shady conditions. Bull. Ent. Soc. Egypt. Econ. Series, 14-73-77.

Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R. (1981). Solar radiation induces sublethal injury in Escherichia coli in sea water. Appl. Environ. Microbiol. 43, 670-674.

Morris, O.N. (1977). Long term study of the effectiveness of aerial application of Bacillus thuringiensis- acephate combinations against the spruce budworm choristoneura fumiferana (Lepidoptera, Tortricide). Can. Ent. 109, 1239-1248.

Morris, O.N. (1983) Protection of Bacillus thuringiensis from inactivation by sunlight. Can . Ent. 115, 1215-1227.

Morris. O.N. and moore, A. (1975). Studies on the protection of insect pathogens from sunlight inactivation.II. Preliminary field trials. Rep. Chem. Control Res. Inst. CC-X-113. 34, PP.8.

Pozsgay, M.; Fast,P. ; Kaplan , H.and carey, P.R. (1987). The effect of sunlight on the protein crystals from Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1 and NDR 12 : a Raman spectroscopic study . J. Invertebr. Pathol. 50, 246-253.

Puztai, M. ; Fast. M. ; Eringorten, L. ; Kaplan H. ; lessard, T and carey .P.R. (1991). The mechanism of sunlight – mediated inactivation of Bacillus thuringiensis crystals. Biochem. J. 273, 43-48.

Ragaei, M.(1990). Studies on the effect of Bacillus thuringiensis Berliner on the greasy cutworm Agrotis ypsilon (Rott). Ph.D. thesis, Univ. of cairo, 266 pp.

٦ــ زيادة كفاءة وفاعلية الباسيلليس تورينجيسيز للاستخدامات الحقلية:

اضـــافه المـــواد الاضـــافية adjuvants مع المبيدات الحشرية الميكروبية لتحقيق الكفـــاءة العالية درس بواسطة العديد من البحاث بهدف زيادة مجالات الاستخدام و الفاعلية او للتغلـــب على مشكلة الثبات القليل لهذه المبيدات الحشرية في الحقل. لقد قام أ.د. سلامة ومعاونوه بتطوير وسائل بيوكيميائية بسيطة لزيادة كفاءة بكتريا باسيلليس تورينجيسيز B.t. ضـــد دودة ورق القطـــن والدودة القارضة . هذه المقالة اعدت بواسطة أ.د. حسين سمير سلامة بالمركز القومي للبحوث ــ مصر.

ثبات Bt في الحقل : Persistence of B.t. in the Field

من المعروف ان بكتريا .B.t لها اثر باقي فعال قصير جدا. الممرض غير متحرك ولا يســـتطيع الهـــروب من الظروف المعاكسة . في حقول القطن المصرية وجد ان ثبات جراثـــيم .B.t اظهر نقصا واضحا بعد يوم واحد فقط من التعرض للظروف الجوية كما ان نقص الحيوية تزايدت بشكل مضطر مع اطالة فترة التعرض في الحقل. لقد ثبت ان نصف فـــترة حـــياة الجراثيم لمستحضرات سلالات بكتريا .B.t اختلفت ما بين ٧٥ وحتي ٢٥٦ ســـاعة كمـــا لـــم تظهـــر ارتباط مع درجة الحرارة الموجودة على سطوح اوراق القطن المعرضـــة للشـــمس. يبدو ان الاشعة فوق البنفسيجية هي العامل المحدد السائد الذي يؤثر علـــى حيوية الجراثيم (سلامة واخرون ١٩٨٣) من الطبيعي اننا اذا نجحنا في اطالة ثبات .B.t فـــي الحقـــل يمكن تحقيق الكفاءة والفاعلية المطلوبة في هذه الوسيلة الحيوية. في هذا المقـــام اشار د. سلامة الى اجراء العديد من الدراسات في معامل المركز القومي للبحوث بهـــدف عزل طفرات من البكتريا قادرة على مقاومة العوامل الطبيعية خاصة الاشعة فوق البنفســـيجية والحـــرارة. لقـــد امكـــن الحصول على طفرات عديدة وتم تقييم كفاءتها ضد الحشـــرات المســـتهدفة. مـــازال هـــناك كثير من العمل يضطلع به فريق من الباحثين في مجـــالات الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية. السبب الذي من اجله تم وضع المسئولية علـــى عاتق الزملاء في مجال الهندسة الوراثية ان التوكسين الذي تنتجه بكتريا .B.t يحدد بواسطة جين منفرد مما يجعل من السهولة نقل مهمة انتاج التوكسين لكائنات حية اخري.

لقـــد اتخذت خطوات جادة لتطوير سلالات .B.t مع مدي واسع في العوائل المحددة والمقـــبولة تجاريـــا. تطويـــر اسلوب الارتباط Conjugation لنقل البلازميدات المشطرة للتوكسين بين عزلات .B.t قد تؤدي الى انتاج سلالات ذات مدي فاعلية واسع. حديثا جدا تـــم انـــتاج النـــباتات المهندسة وراثيا في الولايات المتحدة الامريكية والتى تعبر عن جين

توكسين بكتريا .B.t هذا التطور والانجاز يستلزم اتخاذ الحيطة والحذر حيث انه بالرغم من كونه يحمل افاق مذهلة في مستقبل استراتيجيات وقاية النباتات كما يقدم فرصا تجارية عظيمة لاستخدام منتجات مكافحة الافات التى تعتمد على الممرضات الميكروبية الا ان الامان مازال محل لتساؤلات كثيرة سواء على البيئة و الانسان ومجتمع الحشرات. بالتوازي مع بحوث الهندسة الوراثية تجري محاولات ايجاد اقترابات اخري للتغلب على مشكلة نقص ثبات بكتريا .B.t في الحقول الزراعية.

تقوية فعل بكتريا .B.t من خلال منشطات التغذية والطعوم والمواد الاضافية:

في الاقتراب الاول توجهت البحوث نحو ايجاد المواد المثيرة لبعض الحشرات المستهدف مكافحتها وتقييم الدور الذي تلعبه في زيادة كفاءة .B.t مع توقع ان هذه المواد سوف تجعل البكتريا اكثر قبولا مما يؤدي الى زيادة التناول. لقد اتضح ان مستخلصات بعض النباتات العائلة ومكوناتها المتطايرة وغير المتطايرة اظهرت فاعلية ونشاط في تقوية potentiating تاثيرات .B.t عندما خلطت بها (سلامة واخرون ١٩٨٥-أ). (جدول ٤-٢٠ ، ٤-٢١). كذلك فان المواد الاضافية coax و المولاس ودقيق فول الصويا و السكروز ومخاليطها مع مسحوق ورق القطن او مستخلصاتها يمكن ان تستخدم لزيادة كفاءة .B.t (حافظ واخرون ١٩٨٧) (جدول٤-٢٢).

جـــدول (٤-٢٠) : فعالـــية مستخلصات النباتات العائلة على كفاءة بكتريا B.t. الصنف انتوموسيدس ضد دودة ورق القطن.

مستخلص النبات في غذاء مع بكتريا BT	المستخلصات المائية البتروليوم ايثير				مستخلصات إثير البترول			
	انحدار	التباين	LC50 (ug/ml) التركيز النصفي	Potency (IU/mg) الكفاءة	الانحدار	التباين	LC_{50} (ug/ml) التركيز النصفي	Potency (IU/mg) الكفاءة
1 stseries of tests: السلسلة الأولي من الاختبارات								
Untreated	2.31	0.0066	131.7	77889	1.40	0.0022	138.9	73857
Cotton (Gossypium badadense)	2.08	0.0027	121.6	84359	1.48	0.0041	36.5	281842
Clover (Trifoium alexandrinum)	1.89	0.0031	152.7	67195	2.30	0.0037	89.4	114743
Sweet potato (ipomae batatas)	2.09	0.0041	121.8	84241	2.40	0.0023	69.2	148237
Castor oil (Ricinus communis)	2.25	0.0021	121.6	84345	1.52	0.0034	92.4	111018
Cabbage (Brassica oleraceae var. captitata)	0.88	0.0250	123.81	28853	2.40	0.0027	50.5	203130
Lettuce (Lactuca sativa)	1.73	0.0029	133.0	77147		0.0025	115.1	89123
2nd series of tests السلسلة الثانية من الاختبارات								
Untreated (without extract)		-	-	-	-	1.20	0.022 223.2	14071 0
Jew's mallow (corchorus olitrius)	1.33	0.6530	199.2	.1.33	1.12	0.0510	112.5	279140

جـدول (٤-٢١) : تاثـير التركيزات المختلفة من مستخلص اثيرالبترول لاوراق القطن على كفاءة بكتريا .B.t الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.

%conc. Of extract in the diet with B.t.	slope	variance	LC_{50} ug/ml	Potency IU/mg
1	0.97	0.0809	17.3	241034
0.1	1.64	0.0091	51.1	81602
0.01	0.64	0.0358	91.7	45473
0.001	1.06	0.0036	126.2	33042
المقارنة	0.92	0.0190	113.0	36902

بـناء على هذه النتائج اجري النقراشي ومعاونوه (١٩٨٤) بعض الدراسات بهدف تطويـر طعـوم لمكافحـة دودة ورق القطـن ببكـتريا الباسيلليس .B.t عند اضافة هذه المستحضـرات للممرض كان متوقع ان يجعلها اكثر قبولا للافة المستهدفة ومن ثم تؤدي الـى زيـادة التـناول. لقـد تم اختبار مستحضرات مختلفة تحتوي على نسب مختلفة من المكونـات المتحصل عليها من بذور القطن وفول الصويا للوقوف على فعاليتها مع بكتريا .B.t ضـد الحشـرة المسـتهدفة كمـا استخدم الكواكس كمادة مرجعية للمقارنة. لقد ادت المستحضـرات المحتوية على اغلفة بذور القطن التى تم استخلاصها بالاسيتون ثم مخلوط الاسـيتون ــ هكسـان ــ مـاء الى تحقيق قبول افضل للتناول بواسطة الحشرة بالمقارنة بالمـادة الاضافية المعروفة كواكس. لقد وجد ان زيادة محتوي البذور في الجوسيبول يقلل من كفاءة المستحضرات كما لوحظ مع المستحضرات التى تحتوي على قشور بذور القطن الـتى تـم استخلاصها بالهكسان فقط. التغيرات في الكمية الكلية من زيت بذرة القطن في المستحضر لم يكن له تاثير على الفاعلية بينما ادت اضافة المستخلص الطازج لقشور بذور القطـن بالاسـيتون الى زيادة الفاعلية. المستحضرات التى تحتوي على دقيق فول الصويا كانت عالية الفاعلية.

لقـد اجريت بعض الاختبارات الحقلية بواسطة سلامة ومعاونوه (١٩٨٥-٢) لتقدير نشـاط مستحضرات بكتريا Bt عندما استخدمت على نباتات القطن (جوسيبيوم باربادنيس الصـنف جيزة -٦٩) ضد دودة ورق القطن. بناء على النتائج التى تحصل عليها عن دور منشـطات الـتغذية على يرقات دودة ورق القطن تم اجراء تقييم موسع لمعرفة دورها في زيادة فعالية مستحضرات Bt من خلال زيادة تناول الممرض. في هذه التجارب تم اختبار مفاضـلة بيـن الاصـناف Dipel, kurstaki, subtoxics, galleriae,entomocidus بتركـيزات مخـتلفة سـواء مـنفردة او مخلوطة مع بعض المنشطات الغذائية بالمقارنة

بالكواكس. اظهرت النتائج المتحصل عليها ان اوراق القطن زادت من فاعلية الممرض. لم يثبـت أي مـن منشطات الغذاء التى اختبرت أي تاثير في اطالة نصف فترة حياة جراثيم المستحضـر البكتـيري Bt الذي اظهر تفاوت كبير مع اقصي ثبات مقداره ١١٦ ساعة. اظهر التقييم الحيوي لزيوت فول الصويا وبذرة القطن والذرة (كعوائل طبيعية لدودة اللوز الامريكـية) افضـلية لزيـت فول الصويا عن الانواع الاخري في تحسين كفاءة Bt ضد الحشـرة. دقـيق اللوبـيا وفول الصويا ودقيق الذرة وبذرة القطن وجدت فعالة كذلك يليها القمح والارز والشعير.

جـدول (٤-٢٢) : تاثـير منشـطات الـتغذية المخـتلفة علـى كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضـد دودة ورق القطن (Boisduvalle ١٨٨٣) من رتبة حرشفية الاجنحة.

المواد الاضافية مع الغذاء مع البكتريا Additives incorporated into the diet with B.t.	الانحدار	التباين	التركيز النصفي LC_{50} ug/ml	الكفاءة Potency IU/mg
Untreated (without additives)	1.23	0.015	200.3	30734
2% coax	0.94	0.005	152.3	40420
% coax	0.95	0.005	98.1	62752
0% coax	1.01	0.003	75.4	81645
ucrose 2%	2.01	0.078	110.0	51055
Cottonseed flour 3%+sucrose 1%	1.35	0.041	176.6	31801
Cottonseed flour 3%+sucrose 2%	2.01	0.220	182.6	30756
Cottonseed flour 5%+sucrose 1%	1.13	0.002	158.4	35455
Cottonseed flour 5%+sucrose 2%	1.02	0.005	112.1	50098
Untreated (without additives)	1.46	0.006	185.7	62032
1% molasses	1.105	0.012	170.1	67709
2% molasses	1.55	0.005	162.5	70884
5% molasses	1.16	0.021	105.1	109568
Untreated (without additives)	2.3	0.002	121.9	91565
Cotton leaves powder 5%	1.4	0.021	123.2	90592
Cotton leaves powder 5% + sucrose 2%	1.5	0.001	93.4	119467
Petroleum ether extract of cotton leaves (0.1%)	0.7	0.021	88.3	126336
Petroleum ether extract of cotton leaves 0.1%+2% sucrose	2.1	0.027	64.9	171958
Water extract of cotton leaves 5%	2.1	0.002	121.6	91791
Water extract of cotton leaves 5%+ sucrose 2%	0.9	0.003	89.1	125231
5% soybean flour	0.7	0.018	86.9	128489

تغذية الباسيلليس .B.t عن طريق المواد الاضافية الكيميائية:

في الاقتراب الثاني تم تطوير بعض الوسائل البيوكيميائية للتغلب على مشكلة الثبات القليل لبكتريا الباسيلليس .B.t وفي نفس الوقت لزيادة مجالات فعالية ونشاط الدلتا ــ اندوتوكسين للـ Bt من السلالة كورستاكي HD-1. حتى اواخر الستينيات كان الانتاج الصناعي لبكتريا Bt يعتمد على الطرز السيرولوجي-١ وهو باسيلليس Bt تورينجينسيز كمركب قياسي. لقد اشار Dulmag (١٩٧٣) الى اكتشاف سلالة HD-1 سلالة Bt كورستاكي وهي اكثر كفاءة بمقدار ١٦ مرة (x) عن السلالات السابقة التى استخدمت في الانتاج التجاري. لقد حددت هذه السلالة في امريكا على انها سلالة مرجعية قياسية لتقييم المستحضرات المحتوية على السموم الداخلية او الاندوتوكسينات للبكتريا Bt. بالرغم من النجاح الذي تحقق في مكافحة عدد من حشرات حرشفية الاجنحة باستخدام هذا المستحضر كانت الانواع الاخري اقل حساسية من حرشفية الاجنحة.

لقد تم اختبار مجاميع مختارة من المركبات الكيميائية في هذا السبيل بناء على عدة معايير منها ان المركب يجب الا يكون سام للانسان والحيوان كما لا يكون له اية تاثيرات ضارة على النباتات كما يكون قابل للانهيار الحيوي وكذلك يكون متاح وشائع وباسعار قليلة. الكيميائيات التى اختبرت شملت الاملاح غير العضوية والاحماض الامينية والمواد المستحلبة للدهون والمواد القريبة للبروتين والاحماض العطرية. اظهرت النتائج المدونة في جداول (٤-٢٣، ٤-٢٤) ان املاح الكالسيوم مثل كربونات الكالسيوم واكسيد الكالسيوم تزيد بشكل ملحوظ كفاءة Bt ضد دودة القطن والدودة القارضة . هذا قد يرجع الى حقيقة ان اضافه هذه الاملاح سوف تغير من حموضة المعدة حيث تصبح اكثر قلوية ومن ثم تزيد من تكسير الاندوتوكسين وتحرر الاجزاء السامة. اظهر كبريتات الزنك كذلك تاثير ملحوظ في زيادة كفاءة بكتريا Bt. كيفية احداث الفعل لهذا الملح قد يكون مرتبطا بتاثيرة على الانزيمات المحللة الموجودة في معدة الحشرة. الكاتيونات ثنائية الروابط معروف عنها بوجه عام انها تعمل كمنشطات او عوامل مساعدة للعديد من الانزيمات المحللة للبروتينات.

مع الاحماض الامينية (جداول ٤-٢٥، ٤-٢٦) استيامید، ال-فالين، ال- ارجينين والتريبوفان تزيد من كفاءة .B.t ضد الحشرات المستهدفة من بين المواد المذيبة للبروتين ادت مادة داي صوديوم بيتاجليسر وفوسفات، صوديوم يثوجليكولات الى زيادة كفاءة بكتريا Bt من ٢-٣ مرات ضد دودة ورق القطن. كيفية احداث الفعل لهذه المجموعة قد ترتبط بتاثيرها في خفض رابطة ثنائي الكبريتيد disulphide في جزيئات البروتين

لبكـــتريا Bt ممـــا يـــزيد من ذوبانية الاندوتوكسين في معدة الحشرة (جدول ٤-٢٧). هذه النتائج البشرة امتدت كي تشمل سلالات اخري من بكتريا Bt.

جـــدول (٤-٢٣): تاثـــير الامـــلاح غـــير العضـــوية علـــى كفـــاءة B.t. مـــن الصنف entomocidus ضد دودة ورق القطن.

الكيميائيات التى تضاف مع بكتريا Bt	التركيز النصفي LC_{50} ug/ml	الانحدار	التباين	الكفاءة Potency IU/mg
Control (B.t)	333.0	0.17	0.422	182583
Calcium oxide (0.05%)	43.6	1.20	0.004	1394445
Calcium hydroxide (0.01%)	164.2	0.01	1.016	370280
Calcium acetate (1%)	37.7	1.14	0.010	1612732
Calcium carbonate (0.25%)	55.0	1.02	0.042	1105455
Calcium sulfate (1%)	64.0	0.87	0.025	9500000
Control (B.t)	360	1.30	0.018	168889
Zinc sulfate (0.05%)	15	1.22	0.009	4053333
Zinc sulfate (0.05%)	130	1.28	0.008	467692
Copper sulfite (0.05%)	111	0.91	0.039	547748
Copper oxide (0.05%)	143	1.06	0.008	425175
Sodium sulfite (0.25%)	275	0.40	0.380	221091

علـــى امل سد الفجوة الموجود الان بالنظر الى مدي النشاط والفاعلية وكذلك المدي العوائلـــي والاختيارية البيولوجية. هذه الاقترابات لابد وان تساهم بشكل معنوي في جدوي المكافحـــة البيولوجية حيث انها تقلل من تكاليف الانتاج خلال تاثيراتها الشديدة على الكفاءة ضـــد انواع الحشرات المستهدفة. امكانية الاستخدام في الانتاج التجاري للمبيدات الحشرية البكتـــيرية خلال ادخال هذا المركب الكيميائي في مرحلة ما بعد الحصاد سوف تكون ذات فائدة كبيرة واكثر اقتصادية.

تاثير المواد الواقية من الضوء على فاعلية بكتريا Bt.

مع الاقتراب الثالث تم تقييم المواد الواقية في الضوء photoprotectants.

جـدول (٤-٢٤) : تأثـير الاملاح غير العضوية على كفاءة بكتريا .B.t الصنف جاليري HD-234 ضد الدودة القارضة A.ypsilon

Chemical additive tested الكيميائيات الاضافية المختبرة	LC_{50} ug/ml التركيز النصفي	الانحدار	التباين	Potency IU/mg الكفاءة
Control (B.t.)				
(endotoxin only)	138.16	1.81	0.0047	661494
Calcium carbonate (0.1%)	29.65	3.38	0.00097	3082361
Calcium hydroxide (0.1%)	29.91	2.67	0.0018	3055567
Calcium nitrate (1%)	39.48	1.65	0.0047	2314894
Calcium acetate (0.05%)	37.11	1.98	0.0039	2462732
Calcium sulfate (0.05%)	77.31	1.06	0.0104	869046
Calcium oxide (0.05%)	29.06	1.98	0.0044	186286
Zinc sulfate (0.1%)	18.73	0.86	0.0157	4879445
Zinc sulfite (0.1%)	40.15	1.79	0.0099	2276264
Copper oxide (0.05%)	13.80	1.09	0.0099	6622609
Copper carbonate (0.05%)	9.45	0.91	0.0123	9671111
Copper phosphate (0.05%)	27.75	0.92	0.0120	3293405
Potassium carbonate	7.59	0.976	0.0131	1204110 6

فـي سلسـلة مـن التجارب الحقلية تم تقييم ثلاثة عشر مركب لاستيضاح مقدرتها وكفاءتهـا كمواد تحمي وتقي البكتريا .B.t من الصنف entomocidus ضد يرقات دودة ورق القطـن . لقـد كانت هذه المواد هي : البيومين البيض، الخميرة، البيومين البيض + الخمـيرة ، مستخلص الخميرة ، نشا، سليلوز، زيت بذرة قطن خام، سليلوز + زيت بذرة قطن خام، اكسيد الومنيوم، shade من ساندوز، shade + بولي ميتثيل.

جدول (٤-٢٥) : تاثير المركبات النتروجينية على كفاءة Bt من الصنف entomoeidus ضد دودة ورق القطن.

المركب مع البكتريا BT	LC50 ug/ml	الانحدار	التباين	الكفاءة مللجم
Control (B.t.)	٣٦٠	١,٣٠	٠,٠١٨	١٦٨٨٨٩
L-Trytophane (0.5%)	٢٨	١,٧٣	٠,٠١٣	٢١٧١٤٢٨
L-Arginine (0.1%)	١٠٠	١,٦٧	٠,٠١٢	٦٠٨٠٠٠
(%١)Acetamide	١٥	٢,٠٨	٠,٠٠٥	٤٠٥٣٣٣

جدول (٤-٢٦) : تاثير الاحماض الامينية والاميدات على كفاءة Bt من الصنف جاليري HD-234 ضد الدودة القارضة.

الحمض الاميني المختبر	LC_{50} ug/ml	الانحدار	التباين	الكفاءة وحدة دولية مللجم
None (endotoxin only)	240.70	1.421	0.0040	241961
(DL) Alanine	52.831	0.787	0.0174	1102383
(DL) Serine	33.941	0.983	0.0121	1715919
(DL) valine	33.030	0.875	0.0129	1763246
(DL) tryptophane	14.891	1.322	0.0078	3911087
(L) proline	7.658	1.435	0.0042	7605119
(DL) Ornithine	11.053	2.702	0.0019	4872417
(L) Arginine	6.017	2.263	0.0028	9679242
(DL) Asparagine	9.236	1.252	0.0076	6305760
(DL)Glutamine	8.299	1.042	0.0001	7017713
(DL) Asparic acid	50.365	1.437	0.0058	1156359
(L) Glutamic acid	76.412	1.041	0.0021	762184

جدول (٤-٢٧): تاثير المواد المذيبة للبروتين على كفاءة Bt من الصنف entomocidus ضد يرقات دودة ورق القطن.

المركب الكيميائي مع بكتريا Bt	LC_{50} Ug/ml	الانحدار	التباين	الكفاءة وحدة دولية مللجم
Control (B.t.)	333.0	0.17	0.422	182583
Sodium thioglycollate (1%)	20.3	2.70	0.0048	2995074
Urea (0.5%) Disodium-B-	121	2.40	0.003	502479
glycerophosphate (0.05%)	56	1.02	0.032	1085714
Dipotassium hydrogen Phosphate (1%)	59	0.11	0.022	1030508

الكحول ، شارتول، لبن ببتونيزد . اظهرت النتائج ان النشاط الابادي ضد الحشرات لبكتريا .B.t في المقارنة تناقصت تدريجيا من ٩٢% (عندما تقيم مع الاوراق النباتية المرشوشة في الحال) حتي ٤٣% عند استخدام الاوراق المرشوشة بعد ٣ أيام من الرش. معظم المواد الواقية التى اختبرت اظهرت تاثير واقي ولكن بدرجات مختلفة تبعا لنوع المادة المختبرة. لقد اتضح ان نصف فترة حياة مستحضر Bt طالت حتي ٨,٩٧ يوم بعد استخدام اللبن البيتونيزد بتركيز ٥% بالمقارنة مع ٣,٢٨% في المقارنة. المواد التى تحقق حماية من الضوء تختلف في النواحي الكيميائية و الطبيعية. الخميرة ٥% و البيومين البيض ٥% عندما تستخدم منفردة او مخلوطة مع الخميرة ٥% كانت فعالة كواقيات من الضوء وحماية Bt من فقد الفاعلية مع التعرض للاشعة فوق البنفسيجية . المركب التجاري Shade لم يزيد من نصف فترة حياة Bt كما ان مخلوطة مع البولى فينيل الكحولى لم يزيد من نصف فترة الحياة للبكتريا كذلك.

REFERENCES

Dulmage, H.T. (1973). Bacillus thuringiensis U.S. Assay standard.Report on the adoption of a primary U.S. reference standard for assay of formultations containing the delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis Bull. Entomol. Sco. Amer., 19, 200-202.

Hafez, H. Salama, H.S; About-Ela, R.and Ragaei. M.(1987).Evaluation of adjuvants for use with Bacillus thuringiensis. Vs. Heliothis armigera (Hubn), Z. ang .Ent 103, 313-319.

El-Nockrashy , A., Salama H.s. and Taha F (1984) Development of bait formulations for control of spodoptera litoralis with Bacillus thuringiensis .Z. ang . 101-381-389.

Salama , H.S Foda. M.S. Zaki.f.N. and khalafallah (1983). Persistance of bacillus thuringiensis berliner spores in cotton cultivations Z. ang ent., 95, 321-326.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A. (1984). noval biochemical avenus for endotoxin potency against spodoptera littoralis (Lep., Noctuidae). Entomophage, 29 (2), 171-178.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A. (1985a). Role of feeding stimulants in increasing the potency of Bacillus thuringiensis vs. spodoptera littoralis. Entomol. Gener., 10 (2). 111-119.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1985b). potential of some chemicals to increase the effectiveness of Bacillus thuringiensis against spodoptora littoralis. Z. ang. Ent., 100 425-433.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1986). Possible extension of the activity spectiveness of Bacillus thuringiensis through chemical additives. Z. ang. Ent. 101, 304-313.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1989). Potentition of Bacillus thuringiensis endotoxin against the greasy cutworm Agrotis ypsilon.J.Appl. Ent. 108, 372-380.

Salama, H.s. foda M.S. and Sharaby A, (1985c). Application of Bacillus thuringiensis and its potency for the control of spodoptora littoralis in Egypt. Z. ang. Ent. 99 (4), 425-431.

Van Mellaert, H. ; Vaan Rie, J.; Hofmann, christina and Reynaerts, A. (1988). Insecticidal crystal proteins from Bacillus thuringiensis ; mode of Action and Expreesion in transgenic plants. Proc. Of conference, Biotech. Biological pesticides and novel plant-pest Resistance for insect pest Management, Ithaca, NY, USA, 82-87.

٧ــ الوراثة والبيولوجيا الجزيئية للباسيلليس ثورينجينسيز.

الوراثـــة والبيولوجيا الجزيئية للباسيلليس ثورينجينسيز ركزت في البداية على نظم البلازميد المعقد الذي يوجد بالضرورة في كل سلالات هذا الكائن وكذلك على العلاقة بين البلازمـــيدات والتوكســـينات الابادية للحشرات التى تنتج بواسطة هذه السلالات المختلفة. الـــنقطة الاولـــى التى يسهل تمييزها محدودية البلازميدات في العديد من العزلات الطبيعية المخـــتلفة للبكـــتريا وتبايـــنها في العدد وتوزيع الحجوم. السلالات المختلفة قد تعول من ٢ وحتي ١٤ او اكثر من البلازميدات ذات الحجوم المختلفة. بلازميدات بكتريا .B.t موجودة فـــي حركة ديناميكية في تغير مستمر. لقد تحصل على ادلة من المعامل المتعددة من جراء دمـــج او خلـــط الاقترابات المعنية بما فيها علاج وتغيير البلازميد ونقل البلازميد وتحليل ســـاوثرن مـــع الجيـــنات المشـــفرة للتوكسين مما ادي لعمل استنتاج عام مفاده ان جينات التوكســـين الابادــــة للحشـــرات فـــي السلالات المختلفة عادة تقع على واحد او اكثر من البلازميدات وليس على الكروموسوم. بسبب بعض الاسباب غير المعلومة فان البلازميدات الـــتى تحمل جينات الدلتا-اندوتوكسين تكون كبيرة تتراوح من ٤٤ M دالتون وحتي ١٣٠ M دالـــتون فـــي الحجم بينما البلازميد الاصغر للتوكسين يساوي ٢٩ M دالتون بلازميد HD-1 (Minnich and Aronson ١٩٨٤). هكـــذا قـــدم د. محمـــد على بقسم الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية بالمركز القومي للبحوث – مصر.

بلازمـــيدات التوكســـين قـــد تتكامل في الكروموسوم بينما تحتفظ بالتعبير عن جين التوكســـين ومـــن ثـــم يزال من الكروموسوم لخلق بلازميدات توكسين جديدة ذات احجام جديـــدة (كارلـــتون وجونزالـــيس ١٩٨٥ أ وب). الســـلالات التى تحتوي على بلازميدات توكسين متكاملة قد تكتسب بلازميدات توكسين اخري عبر عملية النقل الطبيعي للبلازميد. ان فهـــم وراثـــة انـــتاج توكســـين .B.t تقـــدم بشكل كبير خلال اوائل الثمانينيات. جينات

التوكسين تقع على بلازميدات خاصة انتقلت من سلالة لاخري وسلالات عديدة التتابع في جينات التوكسين المشفرة بدأ والطريق اصبح مفتوحا الان للمناورات الاخري الوراثية لجينات التوكسين سواء كانت مكلونة او في الحالة الطبيعية. بلازميدات Bt فائقة العدد ذات جينات التوكسين والانتقال علاوة على مقدرتها على الدمج وامكانيات الترجمة و الغرس لابد وان تفتح مجالات جديدة ومثمرة في اتجاه البحوث الاساسية والتطبيقية في السنوات القادمة.

استخدام بكتريا Bt في المكافحة الحيوية للافات اظهرت بعض الصعوبات في الدول النامية وهذه يمكن حلها عن طريق طرق واقترابات الهندسة الوراثية. بعض البرامج البحثية اجريت مستهدفة النواحي التالية:

١- الحصول على سلالات ذات فاعلية عالية في مكافحة الافات.

٢- الحصول على سلالات سابقة دون فقد او خفض في الفاعلية بواسطة الاشعة فوق البنفسيجية والحرارة وغيرها من العوامل الاخري.

٣- انتاج انواع مختلفة من بكتريا Bt متخصصة علي مجاميع مختلفة من الافات.

٤- تقليل تكاليف الانتاج.

٥- حل مشكلة والتغلب على ظاهرة المقاومة ضد الاندوتوكسين.

٦- تطوير نظم ميكروبية رخيصة لتقدير فعالية بكتريا Bt ضد مختلف الحشرات.

٧- تطوير نظم المكافحة الحيوية للفطريات و البكتريا المرضية.

في المرحلة الاولى تم اختيار مستعمرات فردية من سلالات Bt المقاومة للحرارة العالية والاشعة فوق البنفسيجية UV بعد تعريضها لدرجات حرارة عالية او UV وكذلك من خلال ادخال جينات غريبة من انواع الباسيلليس التى تتحمل ٥٠ْم والتى كانت قد عزلت من تربة محافظة اسوان - مصر. لسوء الحظ تحصل على نقص في كفاءة مكافحة

الافــات مــع هــذه السلالات وقد عزي هذا النقص الى فقد البلازميدات التى تحمل جين الاندوتوكســين او حــدوث خلــل ما في بعض النواحي الوراثية بواسطة الجينات الغريبة. المــرحلة الثانية تناولت عزل السلالة المقاومة للكاناميسين (تقاوم ١٠٠ مللجم كاناميسين/ ١٠٠ ملليمــتر وسط) والتى اثبتت ان هذا الجين يرتبط بجين الاندوتوكسين ويقع على نفس البلازمــيد. نهو هذه السلالات في البيئة المضاف اليها كاناميسين سوف يزيد من محتويات البلازميد في الخلايا ومن ثم تزيد من كفاءة انتاج الاندوتوكسين.

جيــن اندوتوكســين Bt تم كلونته في سلالة ازوتوباكتر كروكوم. المتحولات عن طــريق الــنقل transformants الــتى تكتسب هذا الجين في الكروموسوم تم عزلها. لقد وجــدت هــذه المــتحولات ذات فاعلــية ثابتة حيث الجين يقع في الكروموسوم وليس في البلازمــيد الذي تعرض للعلاج والفقد. هذه المتحولات وجدت قادرة على تثبيت النتروجين ويمكــن ان تســتخدم فــي مكافحة الافات والتسميد. لقد كان في الامكان استخدام سلالات بكتريا Bt العائلة كفيروس البوليهيدروزيس وقد ادي ذلك لزيادة فاعليتها. لقد اصبح ممكنا عــزل البوليهــيدروزيس من بعض سلالات بكتريا Bt. عدوي هذا الفيروس في Bt يزيد كفاءتها بواسطة عزل السلالات الليسوجينيك. لقد تاكد ان هذه الفيروسات يمكن ان تفقد من الخلايا من خلال تحفيز التحلل Lysis بواسطة الاشعة فوق البنفسيجية او أي مادة اخري. مــن هــذا الفهــم تم وضع طريقة جديدة عن طريق ادخال الحمض النووي "دنا DNA" للفــيروس علــى الخلايا فقط. لقد وجد ان هذا الاسلوب سوف يوقف أي تحفيز في التحلل فقط ولكن يكسب خلايا البكتريا مقاومة تمكنها من قبول أي فيروس او حمض "دنا" غريب.

الفــاج الــذي يحمل جينات الاندوتوكسين تم عزله من بكتريا .B.t لقد استخدم الدنا الفيروسي الذي يحمل جينات الاندوتوكسين لتحويل الازوتوباكتركروكوكم. لقد ساعدت هذه الطريقة في ادخال الجينات في الكروموسومات. لقد وجد ان المتحولات كانت ثابتة وعالية

الفاعلــية فــي مكافحــة الافات. لقد وجدت فعالة في المكافحة الحيوية لبعض الممرضات الفطــرية مــثل سيكليروشيوم وريزوكتوينا وفيوزاريوم واسبرجللس والترناريا وبنسيليوم. هــذه الطــريقة يمكن ان تستخدم كذلك في تقرير فعالية بكتريا Bt هذه الطريقة تمكن من تغيير انواع Bt عن طريق ادخال جينات غريبة من المصادر المختلفة مثل ستربتومايسيس يثرموفيرديس. يمكن عمل انتاج رخيص من بكتريا Bt من خلال تخمر مركبات سليلوزية ثانويــة مع كائنات دقيقة متخصصة وتنمية سلالات Bt في منتجات تخمر بعد التعقيم. في العديد من الحالات كان نمو Bt ناجحا.

REFERENCES

Carlton, B.C. and Gonzalez, J.M. (1985a). the genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. In : Molecular Biology of the Bacilli. London : Academic press, 211-289.

Carlton, B.C. and Gonzalez, J.M. (1985b). plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of Bacillus thuringiensis. In. Molecular biology of microbial differentiation (Eds. By. J.A. Hoch and P. Setlow), A. soc. For Microbiology, Washington , D.C., 252-264.

Minnich, S.A. and Aronson, A.I. (1984), Regulation of protein synthesis in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 158, 447-454.

٨ـ تطويـر طريقة ELISA جديدة لقياس تركيز الدلتا-اندوتوكسين الذي ينتج بواسطة الباسيلليس ثورينجينسيز Bt.

خـلال العمـل المبكر على الباسيلليس ثورينجينسيز Bt عن طريق التخمر اتضح ضـرورة الحاجـة الى اختبار الكشف عن الدلتا-اندوتوكسين كعمل روتيني في المعامل. حتـي ذلك الوقت كانت الطريقة القياسية لتقدير وجود الدلتا-اندوتوكسين في تخمر بكتريا Bt هـي التقييم الحيوي للناتج النهائي للتخمر. لا توجد قياسات لتركيز الدلتا-اندوتوكسين خـلال الـتخمر متاحة في المراجع العلمية. لقد اشير فقط الى الملاحظات الميكروسكوبية للوقـوف على وجود الاجسام الباراسبورية مثل بللورات الدلتا-اندوتوكسين. التقييم الحيوي لـيس مناسبا كي يستخدم في الاختبارات الروتينية لانها تتطلب تربية الحشرات واليرقات والتى تتطلب وقتا طويلا وتكاليف باهظة. التقييم الحيوي يعاني من عدم الدقة ونقص ثبات تكـرارية النتيجة reproducibility كما لا يستخدم على اساس مقارنة مع درجات كبيرة مـن التحلـيل الاحصـائي للتاكد من غياب اخطاء اساسية. تمثل النتائج على صورة قيم الجـرعات النصـفية القاتلة LD50 وهي الجرعة المطلوبة لاحداث الموت في ٥٠% من يرقات الحشرات المختبرة.

نحـن فـي حاجة لطريقة بسيطة تستخدم بشكل روتيني بدلا من تعريض كل عينة لاختـبار التقييم الحيوي وتقدير LD50 قمنا باختبار تطوير طريقة خاصة بنا عن Elisa لقـياس الدتا-اندوتوكسين. استخدام الطريقة التى تعتمد على الاليزا لقياس تركيزات الدلتا-اندوتوكسين في ناتج تخمر Bt كوظيفة لوقت التخمر الحقيقي لم تجد طريقها للمراجع حتي كتابة هذا المقال منذ عشر سنوات. هذا الاختبار قد يكون له تاثير معنوي على جودة انتاج الدلـتا-اندوتوكسين وقد تكون اساس هذا الاختبار القياسي الجديد للكشف عن وجود الدلتا-اندوتوكسـين لبكتريا Bt. اختبار اليزا Elisa لايحل محل اختبارات السمية على حساسية

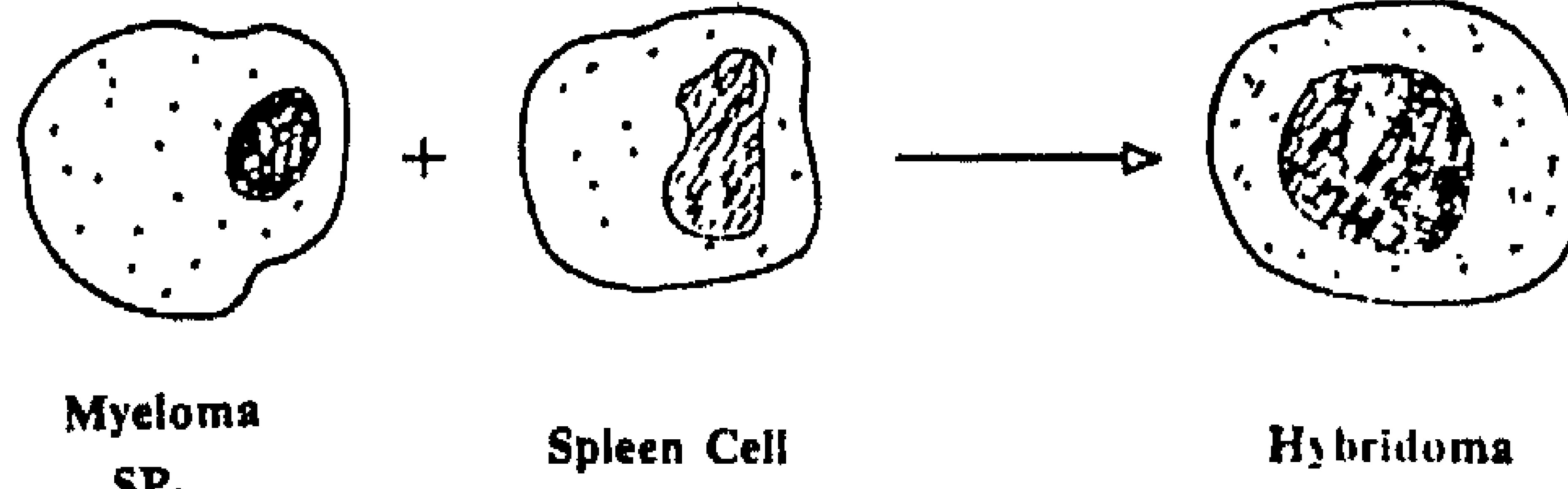
كائـــن حي معين ولكنه يسمح بسرعة الاختبار مع حجوم صغيرة من العينات على اساسي روتينـــي. حيث ان اختبار الاليزا حساس جدا مع مقدرة عن الكشف عن نانوجرامات قليلة مـــن الدلـــتا-اندوتوكسين في كل ملليملتر بيئة التخمر فانه يمكن الكشف عن الانتاج المبكر فـــي المراحل الاولى من التخمر للدلتا-اندوتوكسين(من مقالة البحاث A.Margaritis, J. Kosir and D. te Bokkel). عـــندما يتحقق توفير الكاشف الحيوي biosensor للكشف عـــن الدلتا-اندوتوكسين في معامل البحاث كاتبي المقال فانه سوف يجعل من الاستكشاف الســـريع في العمل الروتيني لهذه المادة امرا سهلا (Margaritis واخرون١٩٩١-أ). هذا يسمح باستكشاف تاثير استرايجيات تغذية التخمر على انتاج الدلتا-اندوتوكسين بشكل اكثر سهولة.

لقـــد امكـــن تطويـــر اقترابان للاليزا : الاول تضمن انتاج الاجسام المضادة عديدة الكلونـــة للارانـــب لاذابة الدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt سلالة HD-1 (kosir ١٩٨٩)٩. تســـتخدم هذه الاجسام المضادة لاختبار عينات من التخمر لتحديد تركيز دلتا-اندوتوكسين. الاقتراب الثاني تمثل في تطوير خط خلايا هيبريدوما hybridoma تنتج جسم مضاد وحيد الكلونـــة متخصـــص ضد الدلتا-اندوتوكسين. في هذا المقام سوف نوضح خطوات تحليل عينات من تخمر Bt بواسطة د. موريس من كندا والزملاء في المركز القومي للبحوث في مصر على تجهيز خاص من بللورات الدلتا-اندوتوكسين.

تطوير خط خلايا هجينية "هيريدوما" لانتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة

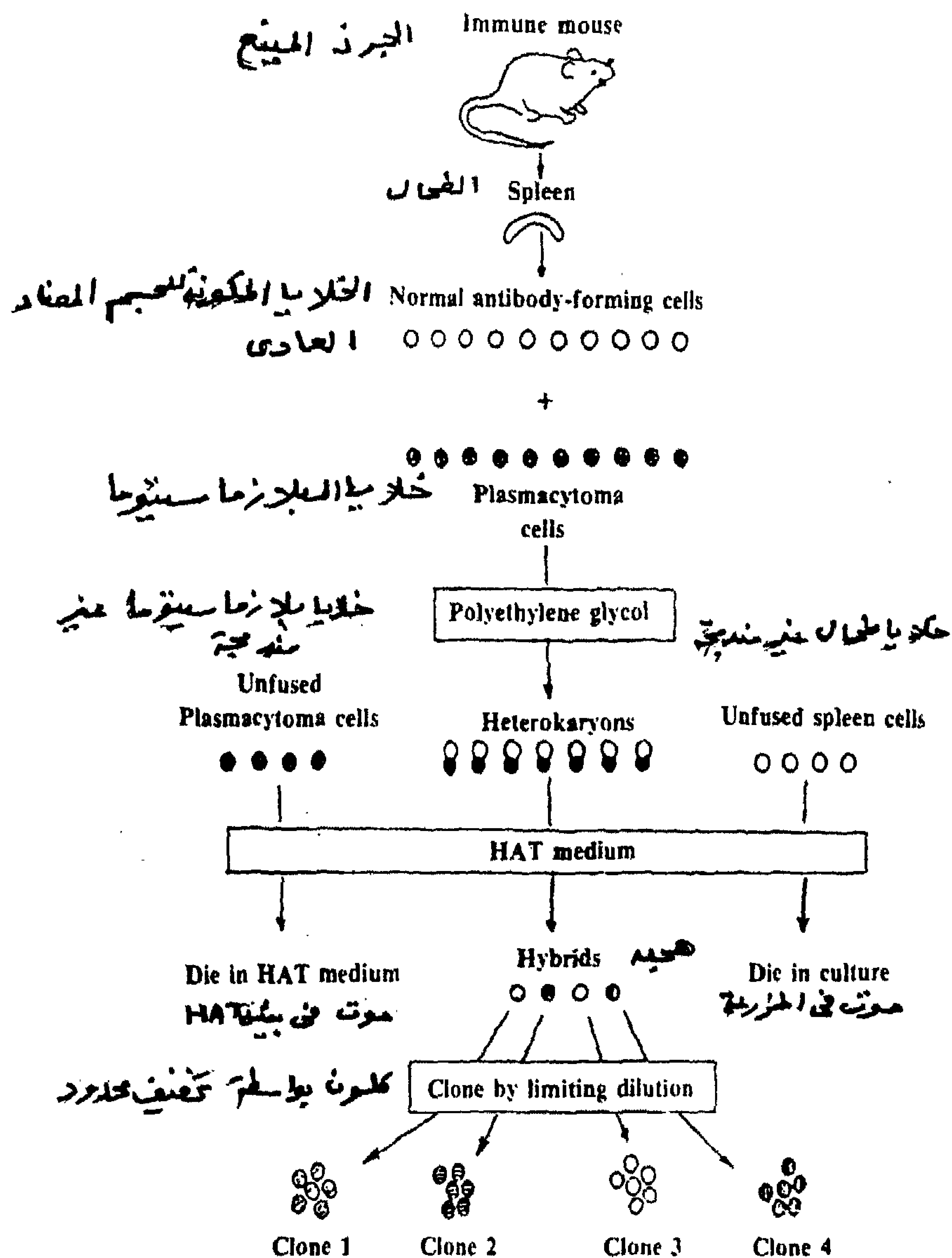
لقـــد تـــم احـــداث المـــناعة في العديد فئران BALB/C بواسطة بللورات الدلتا-اندوتوكسين المذابة بالقلوي و المنقاة من البكتريا Btكورستاكي HD-1 في التخمر. طحال كـــل من هذه الفئران تدمج مع خط خلايا الاورام SP2 في الفئران باستخدام البولى ايثلين

جلـــيكول (PEG) والـهيبوزانســـين امينوثيريـــن ثيميدين (HAT) في البيئة المختارة تبعا لطـــريقة de sd. Groth and scheidegger (١٩٨٠) مع بعض التحوير الشكل (٤-٦) يوضح الخطوات العامة لدمج خلية الهيبريدوما .



شكل (٤-٦) : دمج خلية الورم Myeloma مع خلية الطحال المنيعة لخلق جسم مضاد وحيد الكلونة منتجا خط خلية هيبريدوما.

الشـــكل (٤-٧): يوضح الخطوات التفصيلية لدمج الخلية والهيبريدوما في عملية الانتخاب تفاصيل هذه العملية موجودة في مواضع كثيرة (Margaritis واخرون ١٩٩١-b) وكذلك عملت تحت كلونة للخلايا المدمجة وتم الانتخاب للسلالة التى تنتج الاجسام المضادة وحيدة الكلونة خاصة ضد دلتا-اندوتوكسين كما ذكر سابقا. بمجرد الحصول على العزلة المناسبة فانهـــا تزرع في بيئة دلبيكوالمحولرة (DMEM) لزراعة الانسجة ويتم حفظ عينات سائلة تحت التجمد في النيتروجين السائل.



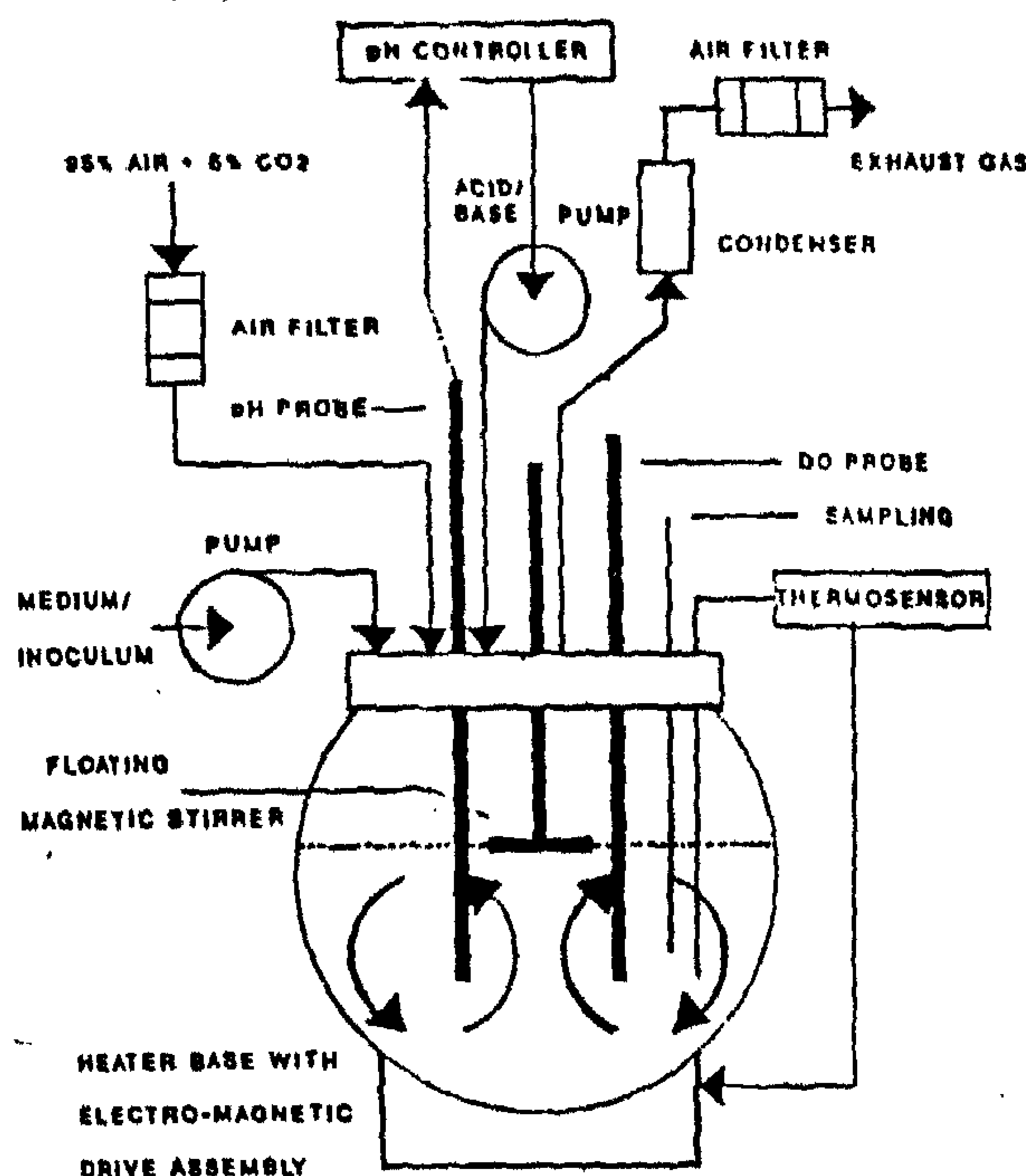
شـــكل (٤-٧): رسـم تفصـيلي لبروتوكول دمج الخلية وعملية خط خلية الهيبريدوما والانتخاب.

إنتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة ضد الدلتا-اندوتوكسين

لقــد تم عمل اقترابان لانتاج الجسم المضاد: الاول تخمير الدفعة batch في نظام فعــال حــيوي قليلة الجز والثانية تشمل انتاج الجسم المضاد في شبة دفعات في نظام فعال حــيوي بــه غشاء خلوي غير متحرك. في كلا النظامين للمفاعلات الحيوية bioreactor كــان يستخدم خلايا الهيبريدوما الجديدة. المفاعل الحيوي قليل الجز Low shear يستخدم لدراســة تاثــير تركــيز سيرم جنين البقر (FBS) على انتاج الجسم المضاد. كان التخمر يجري في نظام المفاعل الحيوي كما في الشكل (٤-٨). لقد ضبطت الحرارة على ٣٧ْم و الحموضة على ٧,٢٥. كان يتم تشغيل الدافع في وحدة الجز القليل على ٩٠ لفة في الدقيقة rpm ثــم تخلط مكونات المفاعل. يتم اجراء تهوية على السطح باستخدام مخلوط من ٥% ثانــي اكسيد الكربون و٩٥% هواء. يتم حقن المفاعل الحيوي بعدوي ١٠% تحتوي على ١٠^٦ خلــية/مليمــتر. يتم استكشاف تركيزات الجسم المضاد الناتج باستخدام طريقة الاليزا الجديــدة. يــتم تقديــر الجلوكوز واللاكتات والجلوتامين والامونيا انزيميا بواسطة وحدات التشــخيص من شركة سيجما كما يتم تقدير الخلايا الكلية والحيوية ميكروسكوبيا باستخدام جهــاز عــد كــرات الدم هيموسيتوميتر hemocytometer وكذلك اختبار صبغة تريبان الزرقاء. يتم قياس الاكسجين الذائب باستخدام محبس Do البولارجرافي.

الشــكل (٤-٩) يوضــح تركيز الخلايا الحية النشطة على امتداد عملية التخمر في المفــاعل الحيوي قليل الجز. تجد الملاحظة ان تركيز الخلية الحية النشطة كانت اكبر من ١,٢٥% مــع بيــئة FBS. بيــئة هذا المستحضر تبني وتعتمد على اساس بيئة خالية من الســيرم يطلق عليها Opti-MEM (Gibco) ان البيئة المقواه الاضافية FBS ٢,٥%، ٥ % كانــت تبنــي وتعتمد على البيئة القياسية DMEM. استخدام ١,٢٥% FBS مع بيئة DMEM ادي الى الحصول على حيوية فقيرة ونمو خلوي بطيء التغير في اساسي البيئة

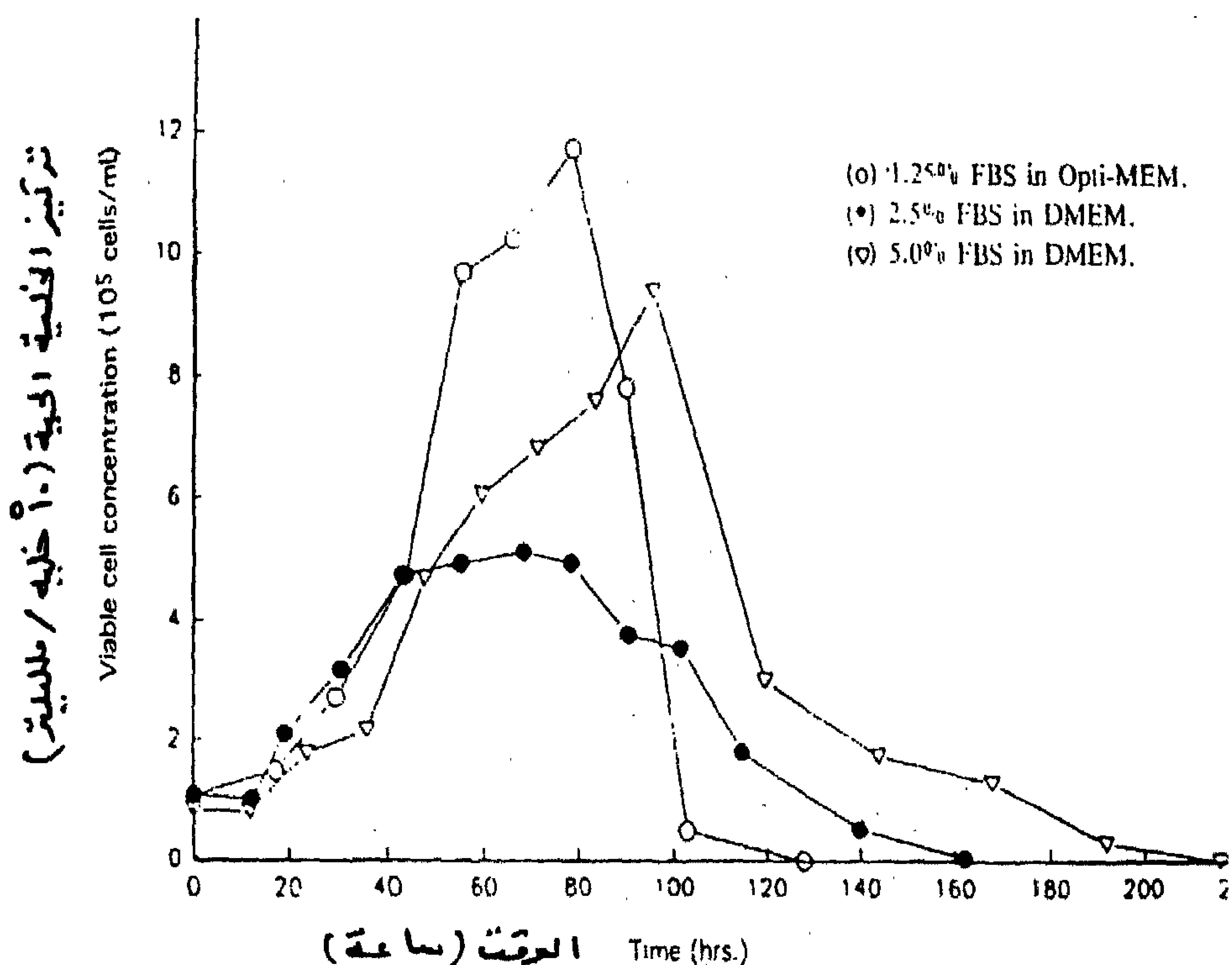
تســمح باضــافات اكــثر قلة FBS مع اقل فقد في انتاج الجسم المضاد. الشكل (٤-١٠) يوضـــح ان ١,٢٥% بيئة OPTI-MEM FBS ينتج اجسام مضادة بسرعة كبيرة وعند مســتوي اقــل قلــيلا مــن ٠,٥% فقط من انتاج بيئة FBS DMEM. هذا يسمح بتقليل اضافات FBS بدون فقد يذكر في انتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة.



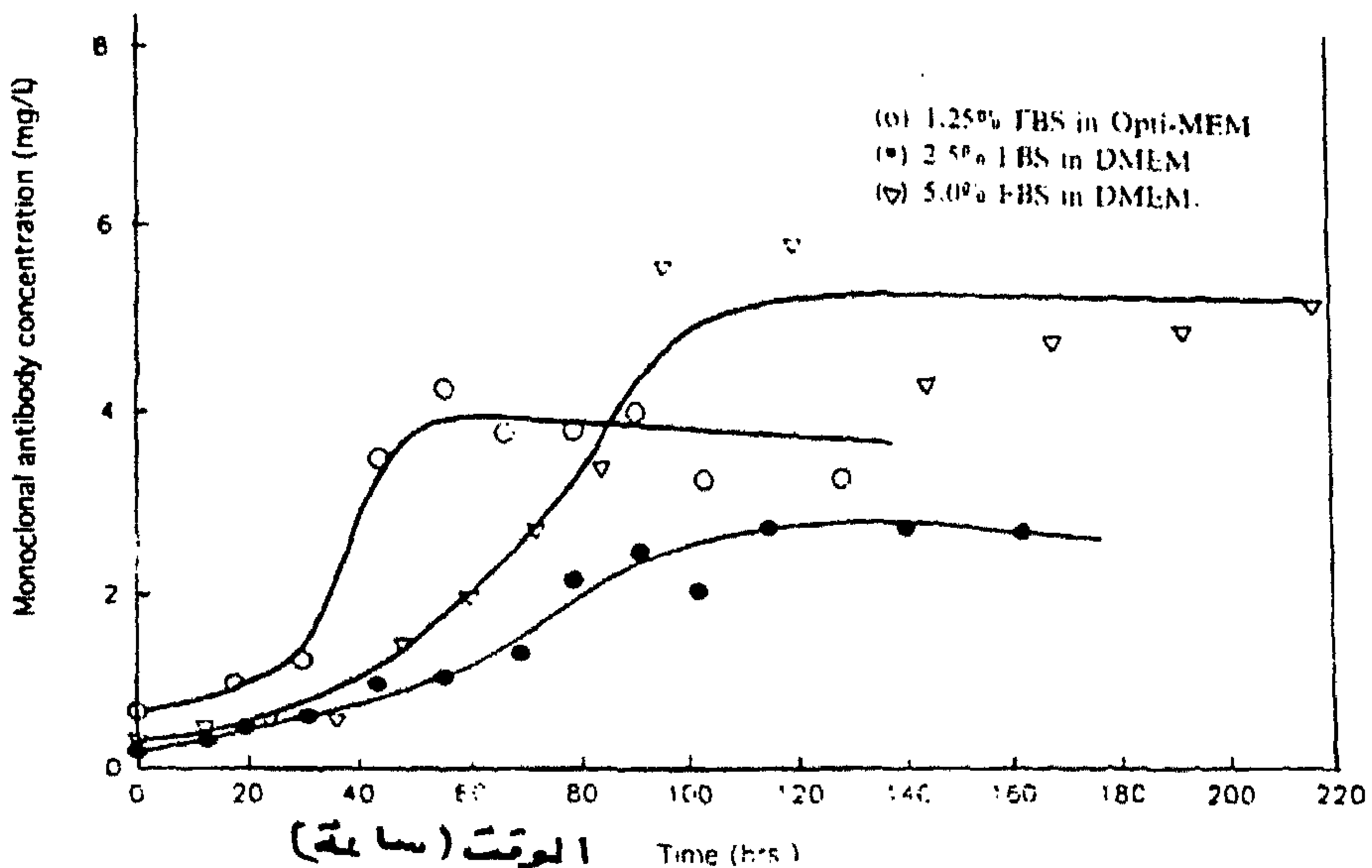
شكل (٤-٨) : رسم توضيحي عن نظام المفاعل الحيوي قليل الجز

نظـــام المفاعل الحيوي ذو الغشاء غير المتحرك موضح في الشكل (٤-١١) والذي يـــتكون مـــن الوحدة القياسية للخلايا غير المتحركة، انبوب تبادل الغازات، مضخة التدوير الوســيطة، مستودع البيئة. البيئة المستخدمة في هذا النظام تنظم على درجة حموضة ٧,٤ وتضـــبط الحـــرارة علـــى ٣٧°م في ٦ % ثاني اكسيد الكربون في الحضانة. وحدة الغشاء موضحة في الشكل (٤-١٢) وهي تحمل مع الخلايا بداية ٤ X ١٠^٧ الخلايا تصطاد بين غشـــائين والتى تسمح بمرور المواد المغذية والتخلص من النفايات والنواتج يتضمن الجسم

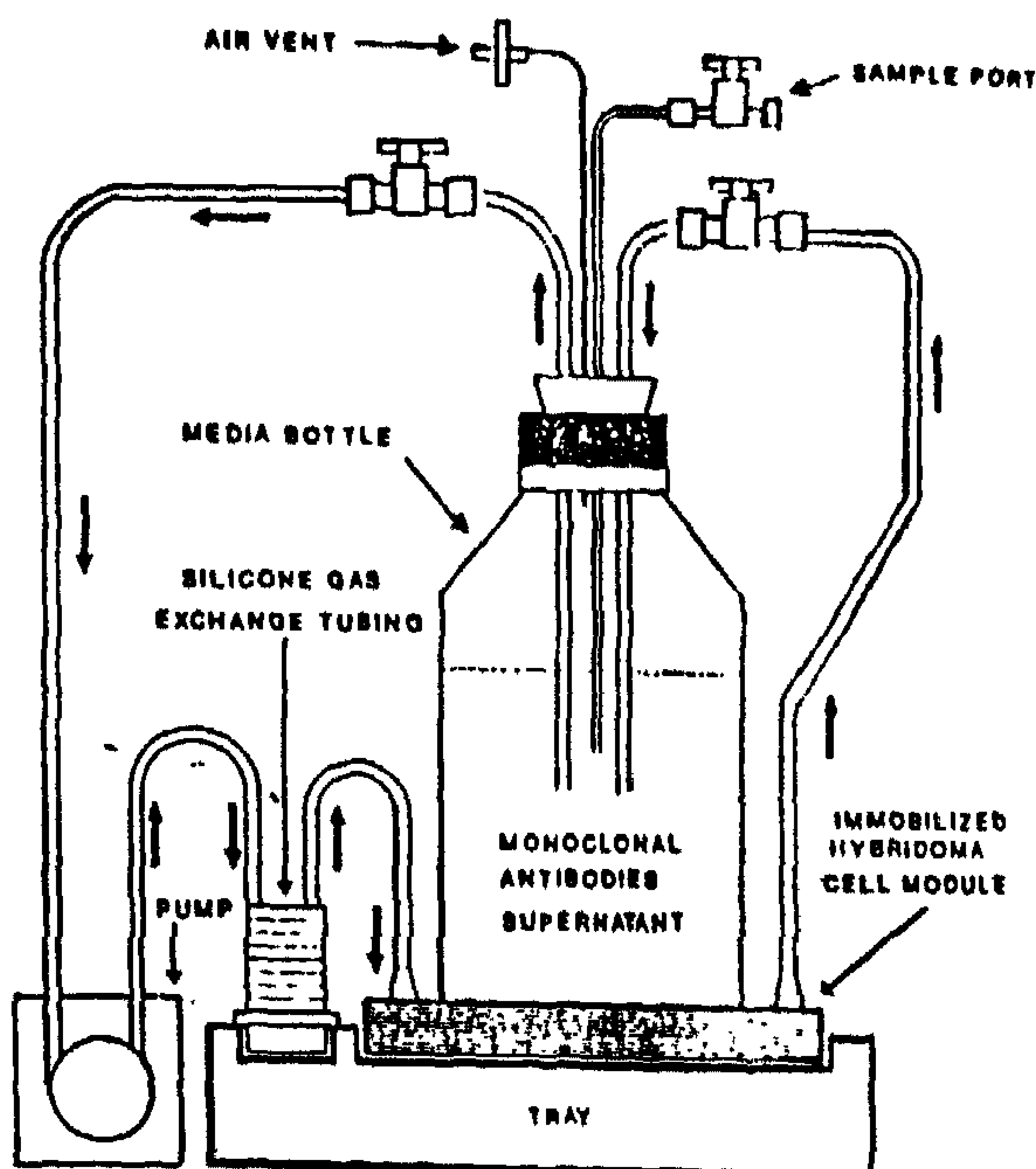
وحيد الكلونة الناتج بواسطة الخط الخلوي. الحجم الكلي الداخلي لمكونات الخلية كان ٨٠٠ ميكروميتر. تركيزات الجسم المضاد وحيد الكلونة كانت تستكشف على اساس مستويات الجلوكوز، لاكتات، جلوتامين، امونيا، وعاء الوسط المغذي كانت تغير كل. ٣-٤ أو ٦-٧ يوم اعتمادا على مستحضر الوسط . وسط DMEM استخدمت حتي ٤٠ يوم بعد استخدام مستحضر بيئة Opti-MEM الشكل (٤-١٣) يوضح مستويات انتاج الجسم المضاد خلال الدورات المختلفة للنظام. لقد تم انتاج ١٣٠ ملليجرام من الجسم المضاد وحيد الكلونة ضد دلتا-اندوتوكسين على امتداد ٣٨ يوم.



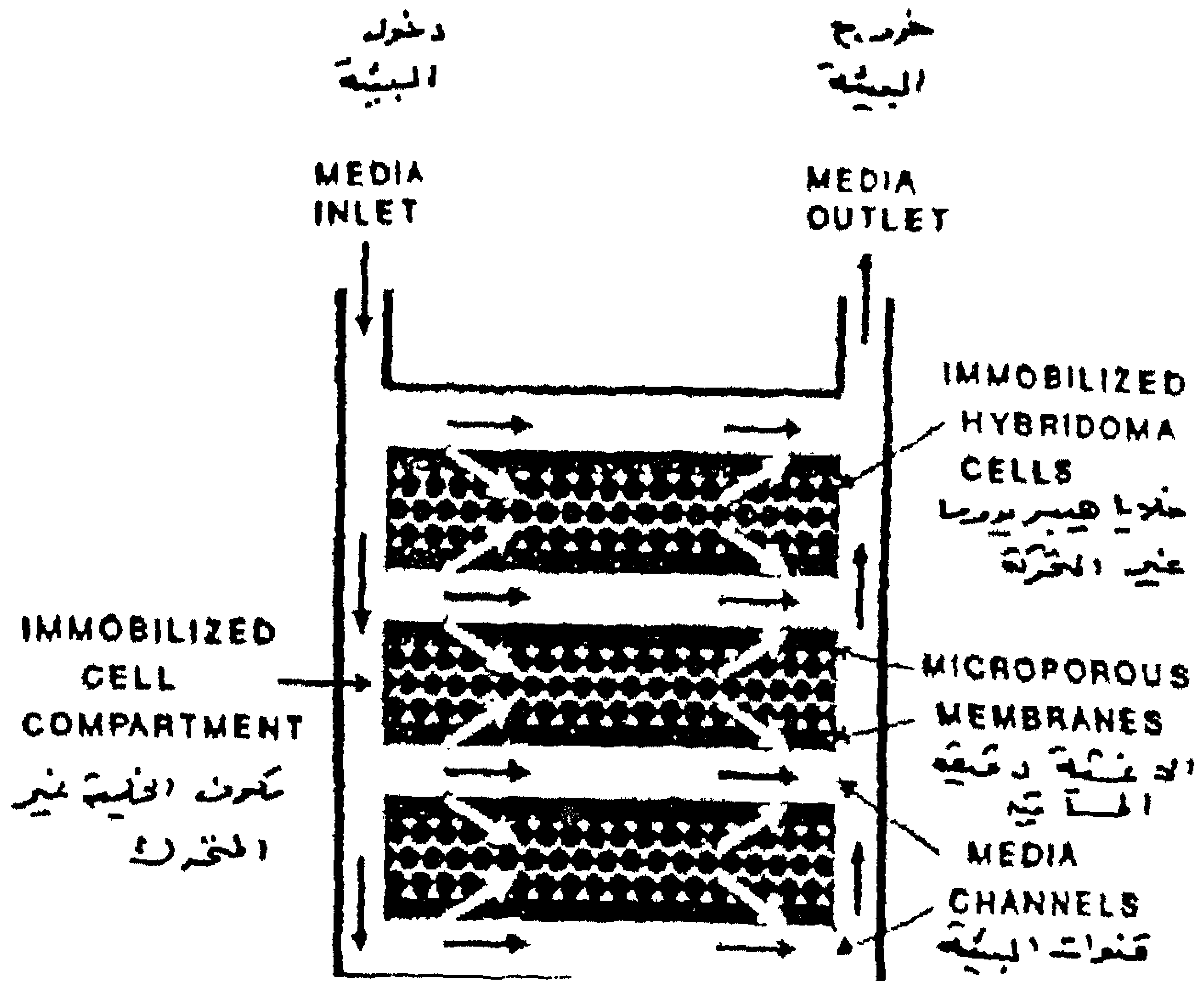
شكل (٤-٩) : بيانات حركية التركيز الخلوي للهيبرويدوما الحيوية من نظام المفاعل الحيوي قليل الجز.



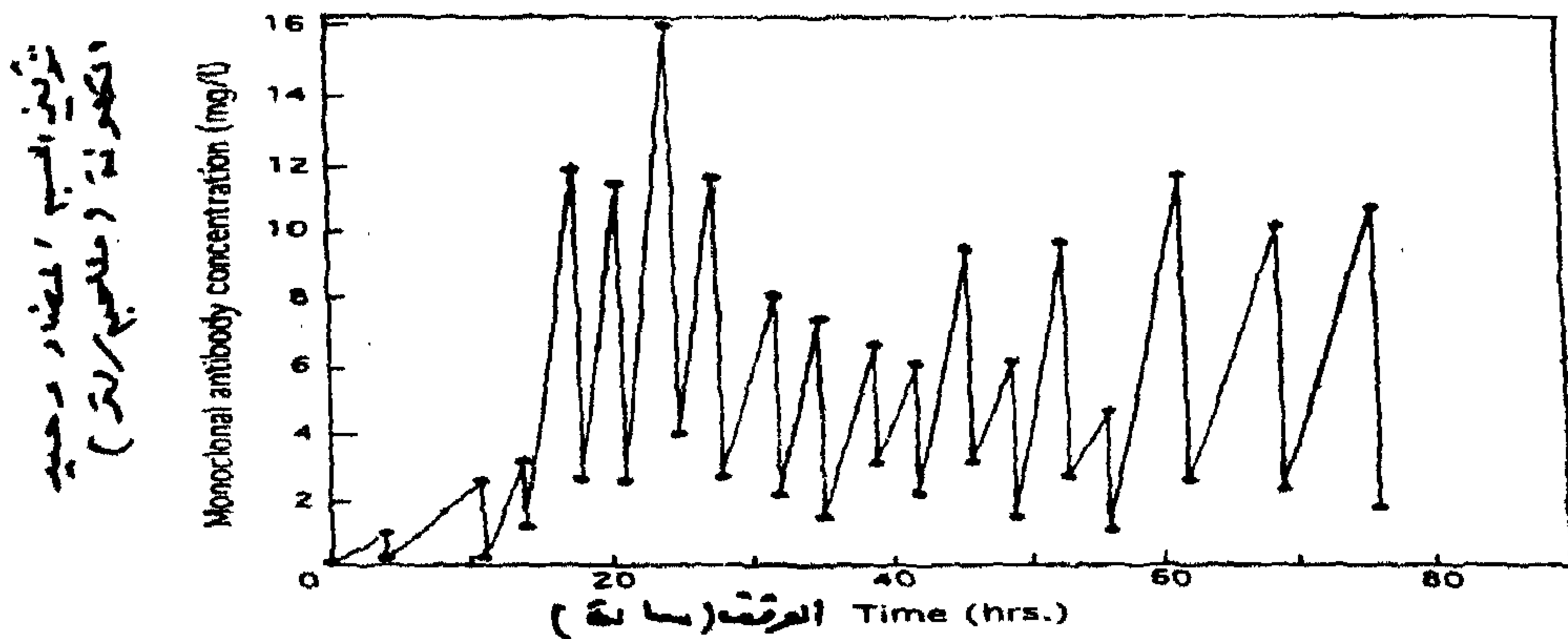
(٤-١٠) : بيانات حركية انتاج الاجسام المضادة وحيدة الكلونةمن نظام المفاعل.



شكل (٤-١١): رسم توضيحي لنظام المفاعل الحيوي لخلايا الهيبريدوما غير المتحرك



شكل (٤-١٢) : تفاصيل الغشاء الخلوي غير المتحرك.



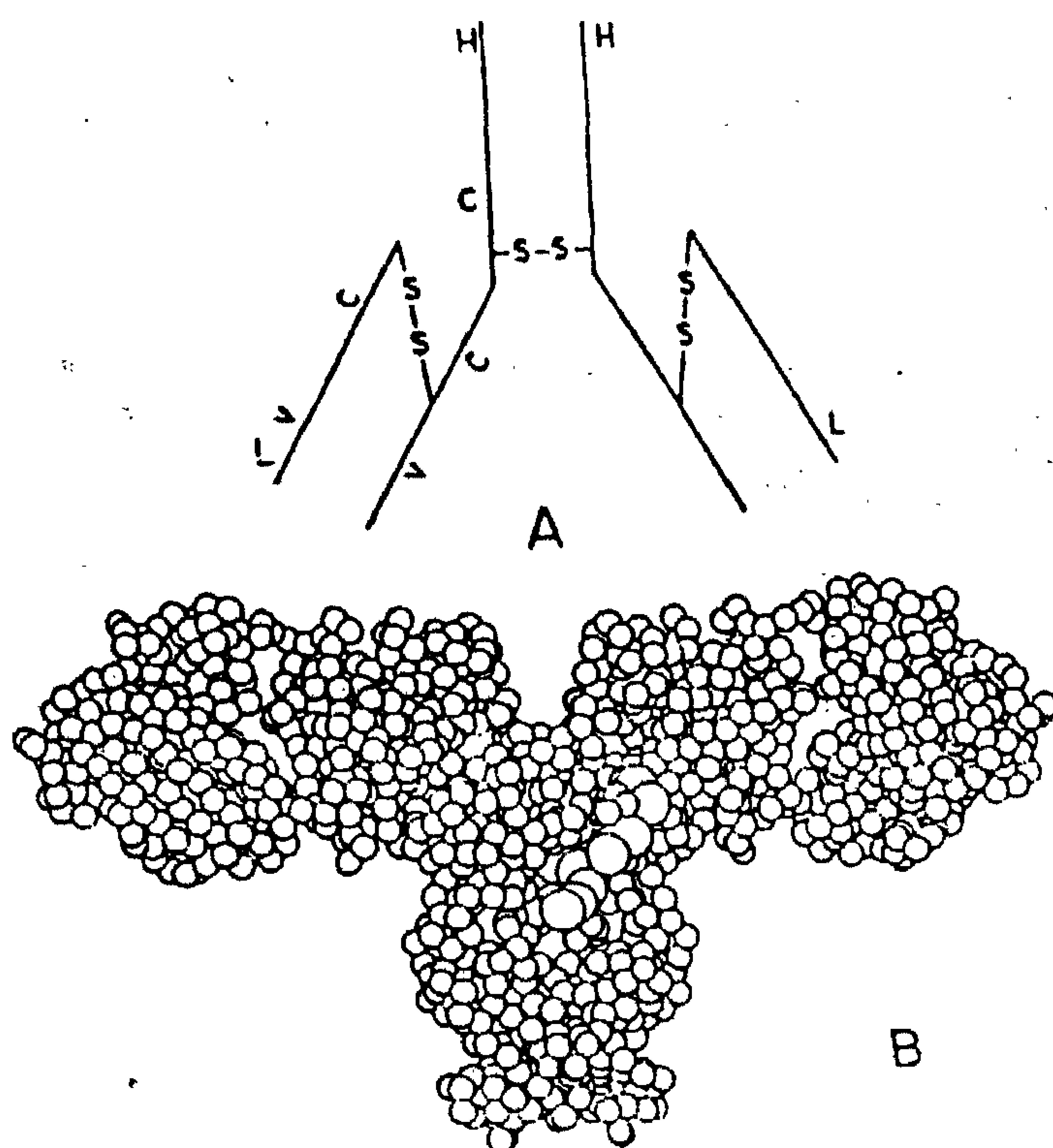
شكل (٤-١٣): بيانات حركية انتاج الجسم المضاد وحيد الكلونة من النظام المفاعل الحيوي لغشاء الخلية.

تطوير طريقة اليزا جديدة لقياس دلتا-اندوتوكسين

الرســوم التوضيحية لتركيب الجسم المضاد موضحة في الشكل (٤-١٤). جزيئات الجســم المضاد الاحادي monomeric تتكون من سلسلتان ثقيلة واثنين خفيفة وكلاهما فبه مــناطق متغيرة واخري ثابتة. نموذج ملأ الفراغ الخاص بالجلوبيولين المناعي G(IgG) اظهــر الطبــيعة المــتفرعة لهذا البروتين المعقد الخاص بالمناعة الجينية. نشاط الاجسام المضادة من كائن واحد ضد اجسام من كائن اخر تعتبر المفتاح لتطور اليزا الجسم المضاد غــير المباشــر. فــي حالتنا هذه تم ارتباط جسم مضاد IgG للفأر من الماعز مع صور البيوتين ومن ثم تكون اساس نظام التفاعل اللوني الذي .يرتبط مع تركيز الجسم المضاد او تركيز الانتيجين اعتمادا على أي صورة اختبار استخدمت.

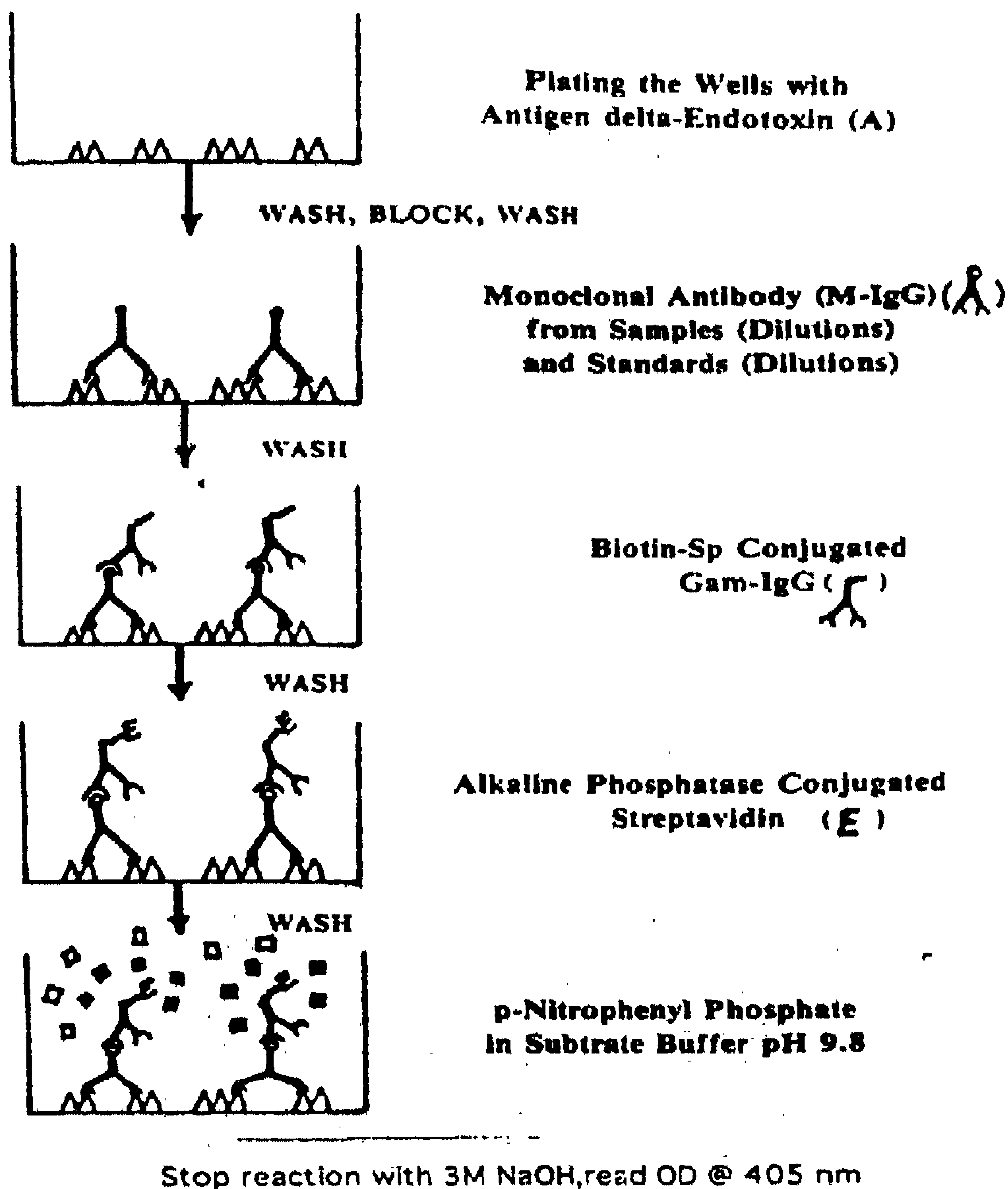
اختــبار الاليزا لقياس تركيز الجسم المضاد موضح في الشكل (٤-١٥): في البداية يــتم تغلــيف الطبق الدقيق بالبولى استيرين مع بلورات منقاه ومذابة في القلوي من الدلتا-اندوتوكســين مع تركيز ٥٠ ميكروجرام دلتا-اندوتوكسين / ممر . يتم التحضين لمدة ١٨ ســاعة علــى درجــة ٥°م ثــم يغسل منظم الفوسفات ثلاثة مرات. بعد ذلك يتم سد الطبق بواســطة ١% جيلاتين في محلول منظم لازالة أي ارتباط غير متخصص للجسم المضاد فــي الطــبق. بعــد ساعة تحضين وثلاثة غسلات اخري يتم تحميل الطبق مع سلسلة من التخفيفات كعينات من الجسم المضاد احادي الكلونة و المواد القياسية ثم تحضن لمدة ٤-٦ ساعات على درجة حرارة الغرفة. بعد ذلك تجري ثلاثة غسلات بمنظم الفوسفات او مولر مــع درجــة حموضة ٧,٢ يتم اضافه البيوتين المعلم للماعزو IgG و المضاد للفئران الى المجــاري وتحضــن طــول الليل على درجة حرارة ٤°م . المجاري تغسل مرة اخري ثم يضاف الكالاين فوسفاتيز المرتبط بالاستربا فيدين الى المجاري و تحضن على درجة ٣٧°م لمــدة ســاعتان بعــد الغسيل يتم اضافة البارا-ينجروفيتايل فوسفات (١ ملليجرام/ملليمتر)

كوســيط في ٩,٧% داي ايثانول امين كمنظم على درجة التفاعل باضافة ٥٠ ميكروليتر ٣ مولر صودا كاوية لكل مجري . يلاحظ ان كل المحاليل قد اضيفت بمعدل ١٠٠ ميكروليتر لكل مجري . التغير في اللون يقاس باستخدام مسجل طبعة الاليزا Titertek Multiscan (PLLUS)على ٤٥٠ نانوميتر.



(a) The monomeric antibody molecule consists of two heavy (H) chains and two light (L) chains. Both have variable (V) and constant (C) regions.
(b) Molecular model of IgG.

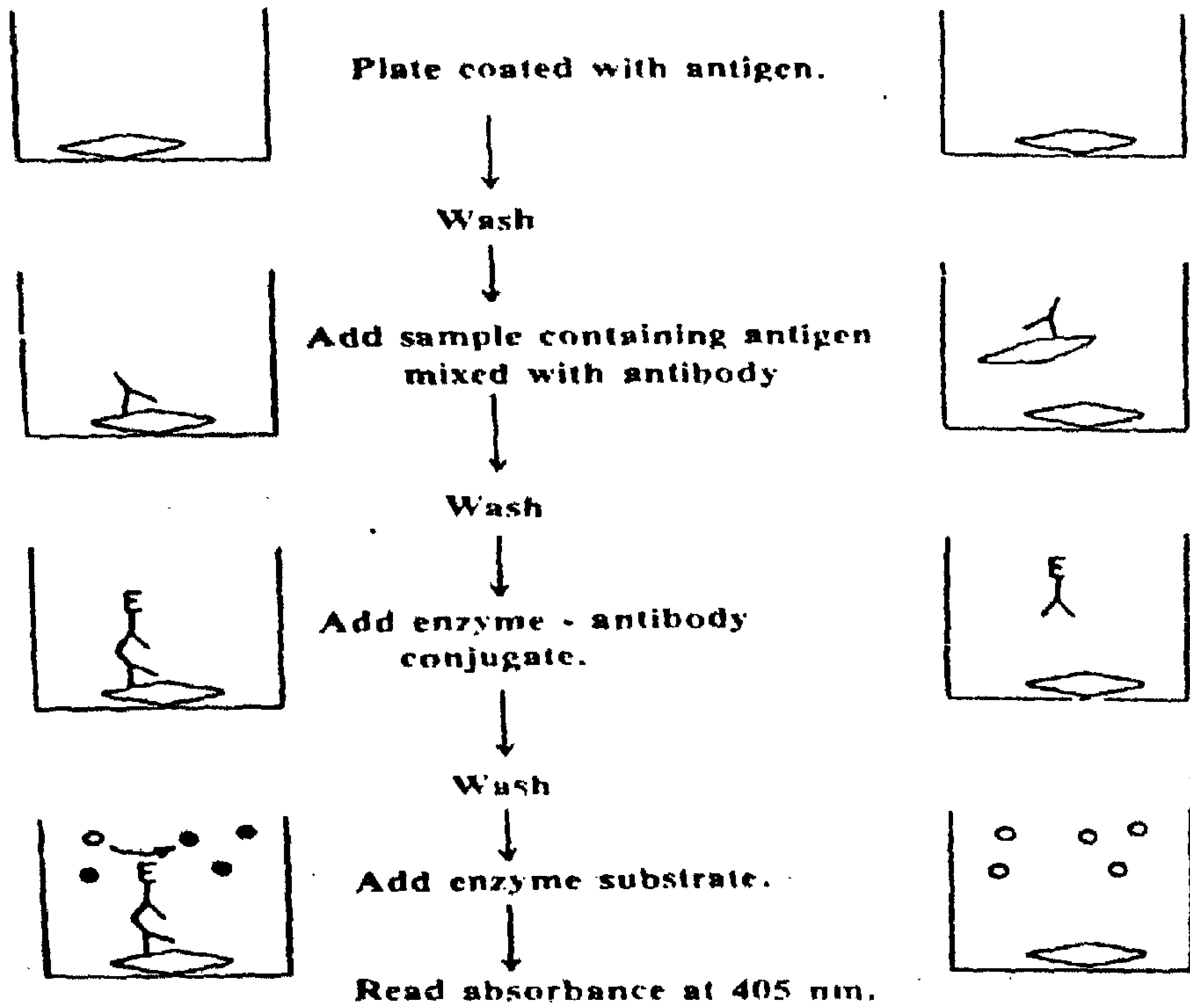
شكل (٤-١٤) : رسم توضيحي يمثل تركيب IgG



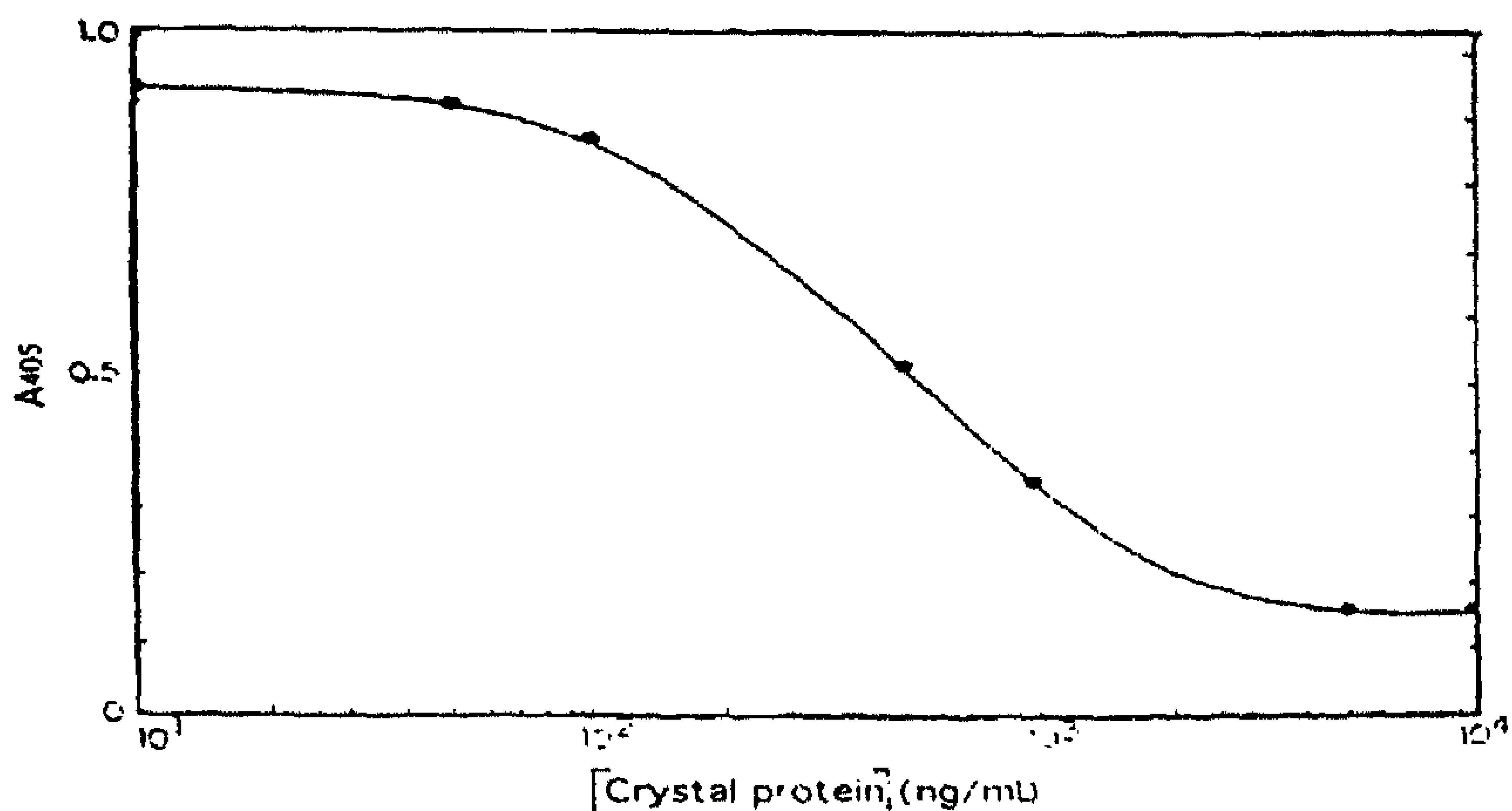
شكل (٤-١٥) : رسم توضيحي لطريقة اليزا الجسم المضاد غير المباشرة.

لقياس تركيز الدلتا-اندوتوكسين: يستخدم الاليزا التثبيطي كما هو موضح في الشكل (٤-١٦). عينات التخمر التى تحلل بهذه الطريقة دائما تعامل مسبقا بالكباس الضاغط الفرنسي عند ٢٠٠٠٠ psi- لتحرير كل الدلتا -اندوتوكسين من الخلايا بعد ذلك يتم اذابة العينات بواسطة الصودا الكاوية ٠,٠٢ مولر لمدة ١٦ ساعة على درجة حرارة الغرفة. تخفيفات

العينات و المحاليل القياسية من الدلتا-اندوتوكسين المذابة تخلط مع تركيز معلوم من الجسم المضـــاد ويســـمح لها بالارتباط. هذه العينات والقياسية تضاف عندئذ للطبق ذو المجرات الدقـــيقة كمـــا حدث قبلا. الجسم غير المرتبط المتبقي يجب ان يرتبط بالدلتا-اندوتوكسين المذابة على الطبق. يستكمل بقية الاختبار كما ذكر سابقا. يقاس تركيز الجسم المضاد على الطـــبق وقـــد وجـــه انه يتناسب عكسيا مع تركيز الدلتا-اندوتوكسين في العينات باستخدام بلورات البروتين القياسية للدلتا-اندوتوكسين يمكن عمل منحنيات قياسية كما في الشكل (٤-١٧) . لذلك فان تطور اللون يعطي تركيز الدلتا-اندوتوكسين مباشرة.



شكل (٤-١٦) : رسم توضيحي لطريقة الاليزا التثبيطية inhibition ELISA



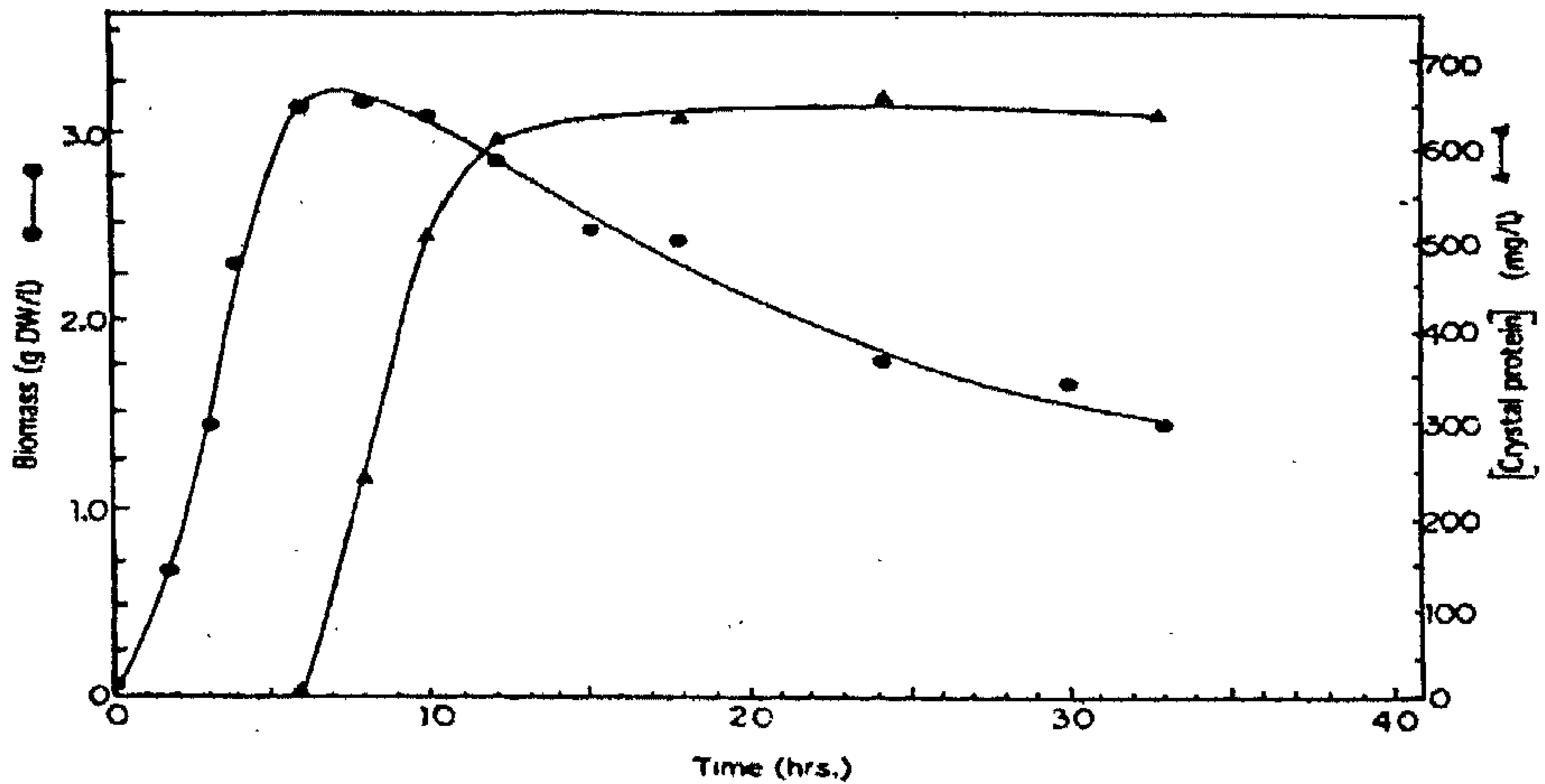
شكل (٤-١٧) : المنحنى القياسي للاليزا التثبيطية باستخدام البروتين البللوري النقي الذائب في القلوي . الجزء الخطي من المنحني النصفي لوغاريتمي يعطي مدي الشغل للتقييم الحيوي . في هذه الحالة ٢٠٠-١٢٠٠ نانوجرام / ملليمتر.

قياس الدلتا- اندوتوكسين في تخميرات البكتريا Bt :

كي نستوضح امكانيات ونجاحات استخدام طريقة الاليزا مع الاجسام المضادة عديدة الكلونة لقياس انتاج الدلتا-اندوتوكسين تم اجراء عدد من التخميرات. النتائج التى تحصل عليها من تخمير واحد لتر للباسيلليس كورستاكي HD-1 لانتاج الدلتا-اندوتوكسين موضحه في الشكل (٤-١٨). اوضحت التجربة تحقيق اقصي كتلة انتاج في ٥-٦ ساعات مع بداية انتاج دلتا -اندوتوكسين بعد ٦ ساعات واستكملت بعد ١٢ ساعة. هذا يحدث قبل التحلل المعنوي للخلية ومعظم الخلايا ماتزال في تلامس في هذا الوقت. يحدث تحلل كامل للخلايا بعد ١٥ ساعة او اكثر. هذا يشير الى حدوث تتابعات مثيرة للانتاج الصناعي ومن الممكن ان يكون التوكسين ثابت. استخدام الجلوكوز عادة يكتمل في ٣ ساعات وترتبط

بـــاقل مستوي حموضة. هذا يرجع الى انتاج الاحماض العضوية خلال تمثيل الجلوكوز (Rowe ١٩٩٠) كلما تقدم تحلل الخلايا يتجه حموضة البيئة نحو القلوية اكثر.

كان لابد من التاكد من كفاءة و صـلاحية ودقة وتكرارية الطريقة لذلك تمت مقارنة كـل التجهـيزات المحتوية على بكتريا Bt في الدراسات المصرية مع السلالات القياسية الدولية وكذلك البللورات المنقاه للدلتا-اندوتوكسين باستخدام طريقة الاليزا (جدول ٤-٢٨). لقـد اظهرت النتائج وجود نشاط للجسم المضاد ضد كل السلالات المصرية NRC B.t. aizawai المختبرة ولكن عند مستويات اقل من السلالات الدولية القياسية B.t. kurstaki HD-1 والتى تم تطوير الاجسام المضادة وحيدة الكلونة. لقد اظهرت السلالة فاعلية شديدة عـندما قيست بطريقة الاليزا لقد اعطت تجهيزات البللورات النقية فعالية اكثر بثلاثة امثال من التجهيز الدولى القياسي. النشاط العبوري المضادة للدلتا-اندوتوكسين لمختلف السلالات Bt لوحظ قبلا Wie واخرون ١٩٨٢.



شـــكل (٤-١٨): قطفة تخمير الباسيلليس تورينجينسيز كورستاكي HD-1 في واحد لتر مـــن مفـــاعل Bellco القـــلاب. يوضــــح الرسم الكتلة الحيوية وبللورات بروتين الدلتا-اندوتوكسين.

جـــدول (٤-٢٨) : تحلـــيل الالـــيزا للدلـــتا-اندوتوكسين في عينات Bt باستخدام الجسم المضاد وحيد الكلونة.

Sample No.	Sample Origin	Delta-Endotoxin Activity (IU/MG)	Ave. Activity (IU/MG)	Comments
HD-1-S-1980	International standard sample B. thuringiensis (B.t.) HD-1, kurstaki	16.000	16.000	Uesd as standard
HD-134	NRC Egyptian sample, B.t. aizawai strain	12.350 12.310 13.310	12.657	
HD-282	NRC Egyptian sample, B.t. aizawai strain	11.570 11.420 12.050	11.680	
HD-133	Dr. O. Morris B.t.aizawai strain	36.680 35.290	35.985	Dr. Morris request
MB2.6/6 0.1	Dr.O. Morris New strain not Identified yet.	13.920 16.180 15.250	15.117	Newstrain of B.T. isolated by Dr. O. Morris, not identified yet, Dr. Morris request.
AM-Crystals	Dr. A. Margaritis purified crystals of delta-endotoxin. B.t. HD-1 var kurstaki	46.110 51.740 47.440	48.430	Purified crystals of delta-endotoxin from B.t. HD-1 var. kurstaki prepared in the lap. Of Dr. A. Margaritis. Used to compare with other B.t. samples from Egypt and O.Morris

Note : All Elisa analysed were done in triplicate with DE NOVO sample preparation and ANA.

Dr. A, Margaritis/mm, July 12.1991.

REFERENCES

De st. Groth, S.F. and Scheidegger. D. (1980). J. Immunol. Methods 35, 1-121.

Margaritis, A., Morgan, T. ; Jiang, L. and peterson, N.O. (1991a). Development of a novel optical fiber biosensor to measure delta-endotoxin in Bacillus thuringiensis fermentation, (work in progress).

Margaritis, A., pham, T. ; Nichols, S. ; te Bokkel, D. and strejan, G.H. (1991b). Kinetics of growth of a new hybridoma cell system and production of monoclonal antibodies against the bioinsecticidal protein delta-endotoxin. Presented at Canadian chemical Engineering conference, Oct. 9,1991, Vancouver, B.C. , Canada.

Kosir, J. (1989). Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for measurement of the bioinsecticide delta-endotoxin in Bacillus thuringiensis fermentations, M.E. Sc. Thesis, Univ. Western ontario, london, Ontariooo, Canada.

Rowe, G. (1990). Central metabolism of Bacillus thuringiensis during growth and sporulation, ph.D.thesis. univ, western ontario, london, ontario, canada.

Sharpe, E.S. Nickerson, K.W.; Bulla, L.A. Jr. and Arosnson, J.N. (1975). Separation of spores and parasporal crystals of bacillus thuringiensis in gradients of certain X-ray contrasting agents. Appl. Microbiol. 30, 1052.

Wie, S.I. Andrews, R.E.; Hammock, B.D. ; Faust, R.M. and Bulla, L.A. (1982).

Enzyme-linked immunosorbent assys for detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of Bacillus thuringiensis subspp. Kurstaki and israelensis. Appl. Environ. Microbiol. 43, 891-894.

الباب الخامس

مختارات في الدراسات التي أجريت في المعاهد البحثية والجامعات المصرية عن فاعلية وأداء سموم وأحداث الفعل في بكتريا باسيلليس ثيرنجيسيز

١- الاختلافات الوراثية بين بعض تحت أنواع بكتريا باسيلليس ثيرنجيسيس للدكتور السيد صلاح على مصطفى للحصول على درجة الماجستير فى العلوم (نبات /بيولوجية / جزيئيه للميكروبات) من كلية العلوم - جامعة المنصورة عام ١٩٩٤.

لقد بدء استخدام أنواع مختلفة من الميكروبات مثل الفطريات والبكتريا والفيروسات فى المكافحة البيولوجية للحشرات الضارة منذ بداية هذا القرن وخصوصا ضد الحشرات الزراعية والطبية واللتان سببتا فقدا كبيرا فى الدخل القومي. ومن أشهر هذه الميكروبات بعض أنواع البكتريا العضوية المتجرثمة (Bacillus sphaericus , Bacillus thuringiensis) والتي تنتج بروتينيات بلوريه الشكل أثناء تجرثمها وهذه البروتينات لها القدرة على قتل الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة وثنائيات الأجنة. لكن بكتريا Bacillus thuringiensis اكتسبت شهره أكبر لذلك تم استخدامها على نطاق واسع لمكافحة الكثير من الآفات وخاصة الزراعية منها. وبالرغم من اكتشاف بكتريا (Bacillus thringiensis) فى بدايات هذا القرن (١٩٠١-١٩١١) الإ أن استخدامها كمبيد حيوي لمكافحة الحشرات تأخر جدا ؛ حتى تم أعاده اكتشاف قيمته الاقتصادية في الأربعينات والخمسينات من هذا القرن وصاحب ذلك جدل حول نوعيه هذه البكتريا وكيفيه التفريق بينها لأنتاج النوع الأكثر قدره على قتل الحشرات تجاريا.

منذ منتصف الأربعينات وبالتحديد في (١٩٤٦) بدء العمل على التصنيف التقليدي للعزلات المختلفة من هذه البكتريا كجزء من عائلة البكتريا العضوية وتم وضعها كجنس مستقل باسم Bacillus thringiensis فقط لقدرتها على إنتاج الأجسام البللوريه والقضاء على الحشرات التابعة للرتب المختلفة ولكن ظل الغموض يحيط بالعزلات المختلفة التابعة لهذا النوع من البكتريا بالرغم من استخدام العديد من الطرق التقليدية والغير تقليديه لتقسيم هذه البكتريا الى تحت أنواع عديدة اعتمادا على الاختبارات المناعية لبروتينات الأسواط المتواجدة على سطح كل نوع واختبارات الكيموحيويه والشكل الخارجي كما تم دراسة

العلاقـة بين تركيب الحامض النووي (دنا) والحامض النووي الريبوسومى (رنا ١٦ أس) لدراسة مدى التقارب بين تحت الأنواع المختلفة التابعة لهذه البكتريا.

كمـا أنـه تم نشر العديد من الدراسات التى استهدفت التفريق بين تحت أنواع هذا الكائن ولكن الإجابات لم تجزم فى التفريق بينهما وظل السؤال حتى الآن بدون أجابه كافيه ومـازال الخلط بين تحت الأنواع قائم ومستمر لذلك استهدفت هذه الدراسة محاولة التغلب علـى بعـض المشـاكل السـابقة عديدة تقسيم تحت هذه الأنواع عن طريق دراسة شاملة لاخـتلافات الوراثـية على المستويات المختلفة مثل المحتوى البروتيني للخلايا الخضريه والخلايـا المـتجرثمة والعلاقـات السير ولوجيه بين البروتينات السامة ودراسة المحتوى الوراثي باستخدام الأنزيمات المحددة وتفاعلات RAPD.

ولقـد تم اختيار عشر عزلات من تحت نوع من هذه البكتريا جميعها تنتج بلورات بروتينـية هرمـيه الشكل سامه للحشرات الاختبارات لرتبه حرشفيات الأجنحة وهى تحت أنـواع alesti kurstaki HD1 – berliner –kenyae – kurstakiHD73- tolworthi –toumanoffi – sotto morrisoni لدراسـة الاختلافات الوراثية بين تلك الكائنات وقد تم استخدام العديد من التقنيات الحديثة والتي اشتملت على الآتي:-

١- مقارنه المحتوى البروتيني للخلايا الخضريه والخلايا المتجرثمة بعد فصله كهربيا لكـل تحت نوع على أوساط جيلاتيه كما نشرت بواسطة (Lammile 1970) وقد تـم إنماء هذه التحت أنواع على أوساط غذائية مناسبة للنمو الخضري، وأخرى تم تشجعيها على التجرثم ؛ ولقد تم تجميع هذه الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي ثـم فتحـت لـتحرير المكونات البروتينية للخلايا عديدة وجود مواد مختزله تحفظ البروتيـنات فى حالة مفرده وينتج عن ذلك تحميل كميات متساوية من هذه التحت أنواع على تركيز مناسب من الأوساط الجيلاتينيه ثم فصلها باستخدام تيار كهربائي ذو جهـد مناسـب لفـترة محـدودة مـن الوقت ثم بعد ذلك يتم صبغ هذا الوسط الجيلاتينى بصبغات متخصصة البروتينات لإظهار مقدار الاختلاف بين هذه التحت أنواع قيد الدراسة ؛ حيث وجد أن هذه التحت أنواع تختلف عن بعضها فى الطرز البروتينـية حـتى بيـن التحـت أنواع المتقاربة جدا مثل Kurstaki HD73 & urstaki HD1).

٢- الـنووي الاخـتلافات بيـن المحتوى البلازميدى لهذه التحت أنواع العشرة وذلك بتنميـتها فـى وسط غذائي غنى لمده ١٤ الى ١٦ ساعة عند ٣٠ درجه مئويه ثم عـزل وتنقـيه البلازمـيدات فى كل تحت نوع من هذه البكتريا باستخدام عدد من

الأنزيمات لفتح الخلايا كما هو متبع فى طريقه (Bron,1990) وتم فصل المحتوى البلازمــيدى تــبعا لوزنهــا الجزئيى على أوساط جيلاتينيه وتيار كهربائي مناسب وظهرت على هيئة حزم خطيه باستخدام صبغه خاصة بعد تعريضها للأشعة الفوق بنفسجية وقد وجد أن المحتوى البلازميدى لهذه التحت أنواع غير متماثل.

٣- اختلاف البصمات الوراثية لكل من المحتوى البلازميدى والمحتوى الكروموسومى لكــل نــوع من تحت هذه الأنواع عند هضمها ببعض أنزيمات القطع المحددة التى تقطــع الحمض المناعية (دنا) عديدة أجزاء محددة كما هو مبين فى طريقه Gill, et. al. 1987 & Gill, et.al. 1985 مما يؤكد الاختلاف والتباين بين تلك التحت أنواع رغم أن هذه الأنواع جميعها تقتل الحشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة.

٤- اختــبارات التفاعلات المختلفة بين تلك التحت أنواع المتجرثمة بالأجسام المضادة المتخصصـــة ضد هذه البروتينات السامة للحشرات حرشفية الأجنحة وذلك بطريقه الانتشار المزدوج (1988 & Bumman, et.al. 1985) ولقد أظهرت تلك إنتاج المخــتلفة لهــذه التحــت أنــواع بعض الاختلافات على الرغم من أن هذه الأنواع جميعها تشترك فى ظاهرة قتل الحشرات حرشفية الأجنحة.

٥- اســتخدام تقنية التفاعل السلسلى البوليمرازى (Carozzi, et. al. 1991) حيث أنه يــتم اســتخدام بادئات صغيره مماثلة لأجزاء محددة من الجينات السامة المعروفة والمنشــور تتابع نيوكليتيداتها لرتبة حرشفيات الأجنحة ويستغرق هذا التفاعل عدة دورات حــرارية ممتابعه تبلغ ٣٥ دوره وتشمل كل دورة تسخين العينة من المادة الوراثــية عــند درجة حرارة ٩٤°م لمدة ٤٥ ثانيه لتحويل جزئ (دنا) الى الحالة المفــردة متــبوعا بالتبريد عند ٤٥°م لمدة ٤٥ ثانيه حتى تلتحم البادئات مع جزئ (دنــا) المفــرد وتسخينها مرة أخرى عند ٧٢°م لمدة دقيقتين حتى تتم البلمرة وبناء قطــع محــددة من (دنا) ذات أوزان جزئيه مقدرة قبل ذلك وفى حالتنا هذه ظهرت قطعتيــن مــن (دنا) الصغرى منها ذات وزن جزئ (٠،٤٩ ك ق) والكبرى ذات وزن جــزئ (٠،٩٠٨ ك ق) وظهــور هاتيــن الحزمتين يعتبر دليلا مميزا لكل المورثــات (الجيــنات) المنــتجة البروتينات السامة لرتبه حرشفيات الأجنحة ولقد وجدت هاتين القطعتين فى جميع التحت أنواع حيث أنهم جميعا يحملون هذا الجين السام.

٦- أســتخدم تقنــية التفاعل السلسلى البوليمرازى بطريقة (Willims, et.al. 1990) باستخدام بادئات عشوائية وهذه البادئات العشوائية تختلف عن البادئات المتخصصة

مـــن حيـــث أنهـــا لا تكون متخصصة عديدة الارتباط مع جين معين ولقد تم هذا التفاعل على عينة كرمووسوم (دنا) من كل نوع من هذه التحت أنواع عديدة سلسلة دورات حـــرارية تـــبلغ ٤٥ دوره تتضمن تسخين لمدة ٤٥ ثانيه عند درجه حرارة ٩٤°م ثم ٣٥°م لمدة دقيقه ثم ٧٢°م لمده دقيقه ولقد أظهر هذا التفاعل على مستوى (دنا) بين هذه التحت أنواع من وجود تماثل واختلاف بين هذه التحت أنواع.

٧- اســـتخدام تقنـــية تهجيـــن الأحماض النووية (Feinberg 1989 & Southern, 1975) مـــع كاشفات ذات تتابع نيوكليتيدى مماثل للجين المسئول عن السمية عديدة المحـــتوى الوراثـــي (البلازمـــيدى) لهـــذه التحت أنواع والتي لها القدرة على قتل الحشـــرات حرشفية الأجنحة؛ حيث أظهرت الدراسات أن هذا أتلجين محمول على بلازميدات ذات أوزان جزيئيه مختلفة وأن موضع هذا الجين على البلازميد فى كل تحت نوع مختلف.

٨- اســـتخدمت المعالجـــات الحـــرارية لتحديد ما إذا كان الجين المسئول عن السمية متواجد على أحد بلازميدات الخلية أو على الكروموسوم (Ward & Ellar, 1983) وذلك بإنماء هذه الكائنات فى أوساط غذائية مناسبة للتجرثم وعند درجات مرتفعه (٣٧°م – ٤٢°م – ٤٥ درجـــه مـــئويه) وقد لوحظ أن كل التحت أنواع قد فقدت القـــدرة على تكوين هذه البلورات جزئيا أو كليا عند درجات الحرارة ٤٢°م –٤٥ درجه مئويه.

٢- الخصائص الجزيئية وتعريف مستقبل سم بكتريا باسيلليس ثيرنجينسيس لإحدى آفات الـذرة الـدودة القارضــة (حرشـفية الأجنحة) للسيد جمال إبراهيم هريدى عثمان للحصــول علــى درجة ماجستير غذائي العلوم – حشرات – مكافحة بيولوجية من كلــية العلــوم – جامعــة القاهــرة عام ١٩٩٦ تحت أشراف أ.د. أمينة محمد عبد الرحمن ، أ.د. ممدوح حسن إدريس.

تمــثل الإصابة بالآفات الحشرية خسارة اقتصادية كبيرة غذائي كثير من المحاصيل الزراعــية لذلك أستخدم المزارعون المبيدات الحشرية لحماية المحاصيل. وظلت المبيدات الكيمائــية أثــناء العقديــن الماضــيين ذات تأثــير فعال غذائي القضاء على الآفات. لكن الاســتخدام المكــثف والعشــوائي لهذه المبيدات تسبب غذائي الكثير من المشاكل للأنسان والبيئة المحيطة به وذلك من خلال تراكم المبيدات غذائي التربة والماء والهواء والمنتجات الزراعية والحيوانية. فأدى ذلك لحدوث خلل بيئي ظاهر وملموس ومن نتائجه الخطرة:

أولا: أن قضــت المبــيدات (حيــث أنها غير متخصصة بدرجة عالية) على كثير من الأعداء الطبيعية ذات القدرة على إصابة وقتل الآفات الحشرية الضارة مما زاد من انتشارها وتكاثرها بأعداد كبيرة.

ثانيا: الخطر الثانى الناجم عن هذه الاستخدامات العشوائية للمبيدات هو ظهور سلالات جديــدة من الآفات الزراعية لا تتأثير بالمبيدات الحالية ومقاومة لها مما يؤدى الى مضــاعفة الخسائر الاقتصادية متمثله غذائي التكلفة الإنتاجية العالية. ولذلك قامت شــركات المبيدات بتصنيع أنواع جديدة من المبيدات ذات درجة سمية عالية وأشد فعالــية غذائي مكافحة الحشرات ولكن ظهر أن الأنواع الجديدة من المبيدات تسبب أضرارا أكثر للأنسان والبيئة والصحة العامة.

كــان شــغل العلماء الشاغل هو البحث عن البديل. فشهد مطلع هذا القرن (١٩٠٢) اكتشــاف العالم أشياوتا لنوعا من البكتيريا العصوية المتجرثمة قادرة على قتل يرقات دودة الحرير. وبعد تقريبا خمسة عشر عاما تمكن عالم آخر بمحافظة ثيرنج بألمانيا من اكتشاف نــوع جديــد مــن هذه البكتيريا أطلق عليه (باسيلليس ثيرنجينسيس) ثم توالت الاكتشافات والأبحــاث حــتى أصبحت الأن ٤٥ تحت نوع (برافو ١٩٩٧). تنتج هذه البكتيريا بروتين ســام للحشــرات علــى هيــئة بللورات أثناء تجرثمها (وسيلة للمحافظة على النوع تحت الظروف البيئية الغير مناسبة). هذه البروتينات البلوريه لمركزي لدرجة عالية حيث أثبتت

الأبحـــاث غذائـــي جميع أنحاء العالم أنها غير ضارة بأى من الكائنات الحية. وتنقسم هذه البروتينات البلورية حسب تأثيرها على الحشرات الى ٦ أقسام رئيسية:

القسم الأول : يقتل الحشرات حرشفية الأجنحة فقط.

القسم الثانى : يقتل الحشرات ثنائية الأجنحة وحرشفية الأجنحة

القسم الثالث : يقتل الحشرات غمدية الأجنحة

القسم الرابع : يقتل الحشرات ثنائية الأجنحة

القسم الخامس : يقتل الحشرات غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة

القسم السادس : يقتل النيماتودا

لقـد تم اكتشاف نوع آخر من البروتينات السابقة ينتج بواسطة هذه البكتيريا غذائي مرحلة التكاثر الخضري له القدرة على التأثير على بعض الحشرات من حرشفية الأجنحة. ومـن الجديـر بالذكر أن المبيدات الحيوية التى تصنع من بكتيريا باسيلليس ثيرنجينسيس تشـكل تقريـبا ٩٠ – ٩٥% مـن مجموع المبيعات العالمية من المبيدات الحيوية. أعطى اكتشـاف هـذه البكتيريا دفعه قوية لنظرية المكافحة البيولوجية للآفات وبعدا جديدا أعتمد علـى تصـنيع مسـاحيق مـن هذه البكتيريا العضوية بواسطة تقنيات التكنولوجيا الحيوية والمخمـرات ويـتم رش النباتات والمحاصيل المختلفة بهذه البكتيريا لحمايتها من الإصابة بالحشـرات الضـارة. ظهرت بعض المشاكل التى تحد من استخدام البكتيريا كمبيد حيوي مـنها أن البروتيـنات البلوريه السابقة المختلفة بواسطة هذه البكتيريا تتكسر وتفقد سميتها بتعرضها لفترات طويلة لضوء الشمس بواسطة الأشعة الفوق بنفسيجيه كما أن رشها على السـطح العلوي يعرضها للغسل بواسطة قطرات الندى والأمطار كما أن معظم الحشرات تـتغذى علـى السـطح السفلي للأوراق مما فتح الباب أمام البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثـي غذائـي نظرية تطوير المكافحة البيولوجية حيث أمكن كلون الجين المسئول عن هـذا البروتين السام غذائي بكتيريا أشرشيا كولاى ودراسة التتابع النيوكلوتيدى لهذا الجين كمرحله وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانية التغيير غذائي التركيب النيوكلوتيدى لهذا الجين لـيكون مناسبا لنقله الى النبات وبالفعل تم إنتاج نباتات محوره وراثيا تحمل هذا الجين لها القدرة على اعتمادا هذا البروتين كمرحله وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانية التغيير غذائي التركيـب النيوكلوتـيدى لهذا الجين له القدرة على إنتاج هذا البروتين السام بدرجه تجعلها تقـاوم الحشـرات ومـن مميزات هذه النباتات المحورة وراثيا أن لها القدرة على توريث الجيـن مـن جـيل الى آخر وبهذا يمكن التقليل أو عدم استخدام الرش المباشر بهذا المبيد الحيوي.

استهدفت هذه الدراسة عزل وتعريف وتنقية وكلونة أحد الجينات من بكتريا باسيللس ثيرنجيسنس لها القدرة على قتل الدودة القارضة كما استهدفت أيضا تعريف وتنقية وكلونة الجين المستقبل غذائي المعى الأوسط لهذه الحشرة ويمكن تلخيص النتائج كما يلي:-

- أن العزلة المحلية BtaC١٨ تحتوى على ١٥ cry سام بالإضافة الى سم Exg-t وأثبتت هذه العزلة قتلها للعديد من الآفات الزراعية غذائي رتبات محدودة.
- تم تنقية البروتين عن طريق كبريتات الأمونيوم ٤٠% ثم بعد ذلك مرورها على جهاز ال HPLC .
- تم اختيار هذا البروتين ضد الدودة القارضة وأعطى نتائج مؤثرة وكانت نسبة ال ٥٠ % تساوى ١٤ نانو جرام لكل سنتيميتر تربيع.
- تم نقل هذا البروتين المنقى الى غشاء بروتيني وتم عمل تتابع للأحماض الأمينية وبناء عليه تم عمل بادئات لمركزي لهذا الجين السام وتم عمل كلونه لهذا الجين.
- تم عمل تتابع نيكلوتيدى لكل الجين وأوضحت النتائج أن طول الـ Coding region ٢٣٠٠ نيوكلوتيده تقريبا ٧٨٩ حمض أميني وتبين من النتائج أن هذا الجين أعطى نسبة تشابه مع ال (Vip) جين بنسبة ٩٧%.
- تم نقل هذا الجين الى Expression vector وتم إعتمادا هذا البروتين غذائي بكتيريا أشرشيا كولاى بكفاءة عالية.
- تم تحديد المستقبل Receptor بروتين لهذا الجين بواسطة تجربة ligand biot هى عبارة عن تعليم هذا البروتين بذرة يود مشع ١٢٥ وقد وجد أن هذا البروتين يرتبط مع مستقبل بروتين غذائي الخملات المبطنة للمعى المتوسط لحشرة الدودة القارضة وهذا المستقبل البروتيني له وزن جزيئى ٤٨ كيلو دالتون.

لتنقية الجين المستقبل Receptor gene

- تم عمل تجربة immunopenricitation وعمل تتابع للحامض الأميني وتم تصميم بادئ للحصول على الجين الخاص بالمستقبل. وتم كلونة الجين وعمل تتابع نيوكلوتيدى لكل جين وتبين من النتائج أن الجين يتكون من ١٣٧٠ نيوكلوتيده ٤١٣ حمض أميني كما تم عمل تشابه لهذا الجين مع الجينات الأخرى وتبين أن نسبة التشابه ٩٣% مع أسرة الـ (Vip) على مستوى الـ DNA.

* تـــم نقل هذا الجين الى Experssion vector وتم اعتمادا البروتين غذائي أشيرشيا كــولاى بكفـــاءة عالية مما سبق تتضح القدرة الفائقة للعزلة المحلية كما يوصـى بإنتاج هـــذا الجيـــن مـــن هـــذه العزلة لإنتاج نباتات محوره وراثيا تستطيع مكافحة الآفات الزراعـــية الاختبارات لرتبة حرشفية الأجنحة لحماية البيئة من التلوث الكيميائي الناجم عن استخدام المبيدات الحشرية غذائي الزراعة.
* كما أن تعريف وتحديد الجين المستقبل Receptor الخاص بالدودة القارضة سيساعد كثيرا غذائي معرفة المستقبل receptor الخاص بالدودة القارضة وهذا سيساعد كثيرا غذائي معرفة طرق مقاومة الحشرات للمبيدات غذائي المستقبل.

٣- "تطــور وتوصيف المقاومة لبعض المبيدات الحيوية غذائي فراشة دودة ورق القطن ســبودوبترااليتوراليس" للســيد/ أحمــد محمــد أحمــد محمد للحصول على درجة الماجستير غذائي العلوم (علم الحشرات) تحت أشراف أ.د. محمد سعد حامد ، أ.د. محمد سيد سلامة ، د. وليد محمد زكى الياسقى عام ١٩٩٧.

اســتهدفت الدراســة الــى تحديد إمكانية اكتساب المقاومة غذائي يرقات دودة ورق القطــن لبكتيريا باسيلس ثيرانجينسيس. استخدمت أربعة عزلات من البكتيريا غذائي هذه الدراســة همــا (باســيلس ثيرانجينسيس اينتوموسيداس ، باسيلس ثيرانجينسيس فينتيماس) والأخريين عزلات جديدة مصرية برموز دى أى ٢٩ ، س ١٢ وقد اشتملت الدراسة على توصــيف خــواص العــزلات المســتخدمة من خلال الفصل الكهربائي لبروتينات الخلايا الخضــرية والجرثومية وتعيين السمية لكل منهم ضد يرقات دودة ورق القطن. استخدمت العازلتيــن أينتوموســيداس ، دى أى ٢٩ غذائي دراسة تطور المقاومة غذائي دودة ورق القطــن وذلــك بتعريض اليرقات لتركيزات منخفضة لمدة ٨ أجيال متتالية ودراسة طرق المقاومــة متــبادلة بيــن هذيــن النوعيــن مــع دراســة طــرق توارث المقاومة لعزلة (أينتوموســيداس) غذائــي يــرقات دودة ورق القطن كما تم دراسة تأثير هذه التركيزات المنخفضــة على بعض الأنشطة البيولوجية للحشرة أثناء عملية الانتخاب للمقاومة. اشتملت علــى عمــر الطــور اليرقــي والنسبة المئوية للتعذر ونسبة الذكور للإناث وعمر الطور العــذري والنســبة المئوية لخروج الطور الكامل ودرجة الخصوبة للإناث وإنتاجية البيض والنســبة المــئوية للفقــس وتم أيضا دراسة تشريحية مقارنة للمبيض في السلالة المنتخبة وكذلــك دراســة هستوباثولوجية للمناسل العادية والناتجة من المعاملة المتكررة. استهدفت الدراســة توصــيف وتقييم بعض العزلات الحقلية من الباسيلليس ودراسة تطور وخواص المقاومــة للعــزلات فى دودة ورق القطن سبودوبترا ليتوراليس" . استخدمت عزلتان من البيئة المصرية تحت دليل اصطلاحي دى أى ٢٩ ، سى ١٢ وتربيتها على وسط ت٣ وقد اســتخدمت طــريقة الفصــل الكهربائي للبروتين لدراسة مقارنة بين الأنواع الأربعة من الباسيلليس وقد اشتملت الدراسة على النقاط الآتية:

١- دراســة حساسية دودة ورق القطن للمبيدات البكتيرية: استخدمت طريقة المعاملة بالتغذية لتعيين حساسية يرقات دودة ورق القطن للمبيدات البكتيرية وذلك بخلطها بالوســط الغذائــي الصناعي لدودة ورق القطن والذي يتكون من خليط مسحوق الفاصــوليا الجافــة (١٥٠جم) والخميرة الجافة (١٥جم) وحمض الأسكوربيك (٣

جـم) ومـادة النيباجين (٣جم) وأجار أجار (٦جم) مذابة في ٦٠٠ مل ماء مقطر وذلك بتعريضها لسلسلة من التركيزات.

٢- دراسـة المقاومة لمبيد بكتيري: تم دراسة المقاومة للمبيد البكتيري دى أى ٢٩ ، مـع النوع المعروف باسيلليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس وذلك بالانتخاب لعدة أجـيال بتركيزات تكفى لقتل ٧٥% من اليرقات المعرضه للحصول على سلالات مقاومة للبكتيريا.

أ ــ عـبور المقاومـة: اسـتهدفت الدراسـة فى العشائر المنتخبة دراسة عبور صفه المقاومـة المكتسبة للسلالتين المقاومتين للبكتيريا دى أى ٢٩ ، باسيلليس ثيرانجينسيس أينتوموسـيداس وذلك بتقدير مستوى المقاومة للمبيد الأول فى السلالة الثانية والعكس بالعكس.

ب ــ وراثـة صفة المقاومة في دودة ورق القطن: كما استهدفت دراسة توارث صفة المقاومـة لاحداهمـا فـي دودة ورق القطـن وذلك باستخدام التزاوج بين الأفراد المقاومة والعادية.

ج ــ دراسـة تأثـير الانـتخاب علـى بعض الأنشطة البيولوجية لحشرة دودة ورق القطن: استهدفت الدراسة تأثير المعاملة المتكررة أثناء عملية الانتخاب على بعض الأنشـطة البيولوجية والتي اشتملت على الخصوبة وفترات النمو اليرقي والعذري والفقس والنسب الجنسية ونسبة خروج الفراش.

د ــ دراسة هيستوباثولوجية: تم دراسة تأثير المعاملة المتكررة أثناء عملية الانتخاب المتكررة على أنسجة مبايض أنثى فراشة دودة ورق القطن وذلك باستخدام الدراسة التشريحية الدقيقة و الهيستوباثولوجية.

اشتملت الدراسة على النتائج الآتية:

١- توصـيف عـزلات البكتـيريا: تـم توصـيف عزلات البكتيريا من خلال الفصل الكهربائـي لبروتينات الخلايا الخضرية والجرثومية لهذه العزلات وقد وجد بعض الاختلافات في الحزم البروتينية للخلايا الخضرية فى العزلات البكتيرية. وقد ظهر مـن خلال الفصل الكهربائي للخلايا الجرثومية وجود حزمة بروتينية عند مستوى ١٣٠ كيلو دالتون وهى تمثل الكريستال (السم المستخدم فى أماته الحشرة).

٢- حساسية دودة ورق القطن للعزلات البكتيرية: أوضحت نتائج الدراسة المقارنة لنسبة الوفيات عند مستوى ٥٠% وذلك بخلط العزلات (الخلايا الجرثومية مع الكرستالات) مع الوسط الغذائي للحشرات على تباين تأثير أنواع البكتيريا وأنه يمكن ترتيب العزلات ترتيبا تنازليا بالنسبة لفاعليتها كما يأتي:

دى أى ٢٩ > أينتوموسيداس > فينتيماس > س١٢

٣- الانتخاب يرقات في دودة ورق القطن دى أى ٢٩، باسيلليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس: أثبتت نتائج انتخاب يرقات دودة ورق القطن المقاومة لكل من العزلتين باسيلليس ثيرانجينسيس أينتوموسيداس ، دى أى ٢٩ وذلك بتربية الحشرة على تركيزات تحت مميتة تعطى ٧٥% وفاه لمدة ٨ أجيال متتالية. وقد وجد انخفاض تدريجي فى مستوى حساسية اليرقات للبكتيريا المستخدمة للأجيال الثالث والسادس والثامن عنها فى الحشرات العادية غير المعاملة. بالنسبة للسلالة التي تم انتخابها للمقاومة بالعزلة دى أى ٢٩ وجد أن التركيزات المسببة للوفيات عند مستوى ٥٠% للأجيال الثالث والسادس والثامن تمثل ٢، ٣ و ١، ٥ و ٨، ٥ - ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المعاملة. أما بالنسبة للسلالة التي تم انتخابها للمقاومة بالعزلة أينتوموسيداس وجد أن التركيزات المسببة للوفيات عند مستوى ٥٠% للأجيال الثالث والسادس والثامن تمثل ٨، ٢ و ٩، ٢ و ٤، ٣ - ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المعاملة.

٤- المقاومة المتبادلة: أظهرت دراسة المقاومة المتبادلة فى كل من السلالتين المنتخبتين للمقاومة للمبيد البكتيري أن: السلالة المنتخبة للمقاومة بالعزلة دى أى ٢٩ أعطت مقاومة للعزلة أينتوموسيداس بمستوى ٧، ١٤ -ضعف التركيز اللازم لقتل الحشرات العادية غير المنتخبة عند مستوى ٥٠%. بينما وجد أن السلالة المنتخبة للعزلة أينتوموسيداس فقد أعطت مقاومة للعزلة دى أى ٢٩ بمستوى ٢،٢ مرة فقط.

٥- توارث صفة المقاومة لعزلة أينتوموسيداس في يرقات دودة ورق القطن: أثبتت دراسة حساسية الجيل الأول الناتج من التزاوج المتبادل لأنثى طبيعية مع ذكر منتخب ضد عزلة دى أى ٢٩ والعكس بالعكس وجد أن قد أنتج هجينا به صفة المقاومة لعزلة/ أينتوموسيداس صفة سائدة جزئيا وقد انتقلت بواسطة الجنسين أ ى ليس هناك ارتباط بينها وبين الأجناس وأنها محملة على كروموسومات جسدية

ويلزم لهذه الدراسة دراسة تكميلية لتحديد أعداد الجينات المسئولة عن توارث صفة المقاومة في يرقات دودة ورق القطن.

٦- تأثـير المعاملات المتكررة بالعزلات البكتيرية أثناء الانتخاب على بعض الأنشطة البيولوجـية لـدودة ورق القطـن: دلت النتائج على ازدياد ملحوظ فى طول العمر اليـرقى وذلـك في جميع الأجيال التى تم انتخابها فى كل من السلالتين المنتخبتين. انخفـاض النسبة المئوية للتعذر بدرجة كبيرة فى كل من السلالتين المنتخبتين عنها فى السلالة العادية. لم تؤثر المعاملة المتكررة على نسبة الذكور الى الأناث فى كل مـن السـلالتين المنتخبتيـن بالنسبة للسلالة العادية. لم يتأثر طول العمر العذرى بالمعـاملات البكتـيرية أثـناء فترة الانتخاب للمقاومة. لم يتأثر أيضا نسبة خروج الفـراش بالمعـاملات البكتـيرية أثناء فترة الانتخاب للمقاومة. انخفاض شديد فى خصـوبة الحشـرات فـى كل من السلالتين المنتخبتين. انخفاض معنوي لمستوى الإنتاجية للبيض إلا أن من البيض الناتج قد أثبت خلال التحليل الإحصائي لم يظهر لـه فرق معنوى بين السلالتين المنتخبتين والسلالة التي لم يتم انتخابها للمقاومة فى نسبة الفقس. التأثير الهيستوباثولوجى نتيجة الانتخاب للمقاومة على الجهاز التناسلي للإنـاث. أظهرت الدراسة التأثير الهيستوباثولوجي للعزلتين باسيلليس ثيرانجينسيس اينتوموسـيداس ، دى أى ٢٩ فـى وجـود فراغات فى كل من الخلايا المبيضية والخلايـا المغذيـة، ووجـود فجوات ونقص كبير فى المخ نتيجة انكماشه وأعادة امتصاصه وفقدان الخلايا المبيضية لشكلها المستقل.

٤- "التأثيرات المبيدية والفسيولوجية لبعض السموم الطبيعية" للطالبة/ سمية السيد على السيد للحصول على درجة دكتور فلسفة فى العلوم الزراعية تحت أشراف أ.د. ممدوح حسن إدريس أ.د. نجلاء أحمد عبد الله ، د. محمد سيد سلامة عام ١٩٩٧ من كلية الزراعة – جامعة الأسكندرية

تناولت هذه الدراسة تأثير بعض السموم البروتينية من أصل نباتي (سم بكتريا Bacillus thuringiensis) وكذلك بعض السموم الحيوانية (سموم العقرب المتخصصة ضد الحشرات Lqhit 2 & Aait) وذلك ضد بعض حشرات حرشفية الأجنحة. هذا وقد استخدمت طرق التقنية الحيوية فى تخليق الجينات الخاصة بسموم العقرب وتم إدخالها الى الفيروس المعروف بأسم Baculovirus حيث تم إنتاج فيروس مهندس وراثيا يحوى الجين الخاص بإنتاج بروتين سم العقرب المضاد للحشرات ومن ثم تم اختبار التأثير المميت لفيروس الباكولوفيرس بالمقارنة مع الفيروس المهندس وراثيا لمعرفة مدى نجاح المنتج ومعنوية التأثير. وقد تم دراسة تأثير مبيد بيريثرويدى بغرض المقارنة بين طرق المكافحة الحيوية للحشرات والتي تعتمد على استخدام ممرضات الحشرات التقليدية (بكتريا وفيروس) والغير تقليدية (فيروسات مهندسة وراثيا) وتلك الطرق الكيميائية.

وفيما يلى تفصيل أوضح لهذه الموضوعات الموجزة:

أولا : تأثير السموم الطبيعية ذات الأصل النباتي على حشرة من حرشفية الأجنحة

تم دراسة ست سلالات من البكتريا الممرضة Bacillus thuringiensis وهى:

(1) Kurstaki HD-1 (4) aizawai TMM3-32

(2) aizawai (5) sotto kMk1-36

(3) wuhanensis (6) indiana

اختبرت هذه السلالات عن طريق جرعات (٢٠،٤٠،٦٠،٨٠،١٠٠ميكروجرام/ لكل يرقة) وذلك عن طريق خلطها بالبيئة النصف صناعية والتي اختبرت على يرقات العمر الثالث لدودة اللوز الأمريكية Heliothis zea وقد ثبت من النتائج المتحصل عليها أن السلالات من رقم ١ حتى رقم ٤ كانت ذات فاعلية عالية على يرقات العمر الثالث لدودة اللوز الأمريكية. حيث كانت الجرعة المميتة ل ٥٠% عند استخدام السلالات الأربع الأولى ٤٣،٣٠،٤٩،٦٠ ميكروجرام لكل يرقة على التوالي بينما كانت أكثر من ١٠٠

ميكزوجرام لليرقة فى حالة السلالتين ٥ و ٦. كذلك تم اختبار الجرعات حول الجرعة المميتة ل ٥٠% ضد كل من العمر اليرقى الثانى والرابع للسلالات السابق ذكرها وكان لهـا نفـس التأثير. تم دراسة التراكيب النسيجية بالمجهر الإلكتروني لخلايا القناة الهضمية الوسطى لليرقات المعاملة بغرض توضيح التأثير الممرض لهذه البكتيريا حيث تبين ما يلي: انبعاج الخلايا الطلائية المبطنة للقناة الهضمية الوسطى وانتفاخها واختفاء الأهداب وظهور بعض البقع داخل الخلايا وكذلك تحطم هذه الخلايا وكانت التأثيرات الهستولوجية للسلالات المختلفة المستخدمة مواكبة لتأثيراتها المميتة على الحشرات.

ثانيا : تأثير السموم الطبيعية من أصل حيواني على حشرة من حرشفيات الأجنحة

من المعروف أن الفيروس Baculovirus من الفيروسات المتخصصة على الحشرات ويعطي تأثيرا مميتا وأن كان بطيئا نسبيا حيث تم اختبار هذا الفيروس ضد ديدان الحرير التوتية Bombyx mori فى عمرها اليرقى الرابع والخامس عن طريق الحقين حيث تم تقدير الفترة اللازمة لموت ٥٠% من الحشرات فكانت ١١٨,٨ ساعة ليرقات العمر الرابع و ١٢١،٤ساعة ليرقات العمر الخامس. عن طريق استخدام طرق التقنية الحيوية الحديثة يمكن زيادة كفاءة هذا الفيروس. فمن المعروف أن هناك بعض البروتينات المميتة للحشرات والموجودة فى سم العقرب من النوع Leiurus quinquestriatus hector والنوع Androctonus australis والتي تؤثر في المقام الأول على قنوات الصوديوم فى الجهاز العصبي للحشرات. وقد تم تخليق الجين الخاص بسم العقرب Lqhit2 والمكون من ١٨٣ نيكولتيدة كذلك تم دراسة تأثير تطويل السلسلة النيكلوتيدية لهذا السم حيث أنتج جين يحتوى على ١٩٢ نيكلوتيدة (Lghit 2M1) وآخر يحتوى على ١٨٦ نيكلوتيدة (Lghit 2M2) كذلك خلق الجين الخاص بالسم العقربى المعروف بأسم AaIt وهذا الجين يحتوى على ٢١٠ نيكلوتيدة. أيضا تم إنتاج طفرتين لهذا الجين حيث حل الحامض الأميني أيزوليوسين محل الحامض الأميني ليسين رقم (٥٢) و سمى Aait 18 وتم إحلال الحامض الأميني تيروزين محل الحامض الأميني سيستثيين (رقم ٦٤) وسمى Aait 19. وقد أظهرت النتائج أن فيروسات الباكولوفيروس المهندسة وراثيا والمحتوية على الجينات Lqhit 2M1, Lqhit 2M2 , Lghit 2, قد أدت الى إسراع موت يرقات ديدان الحرير فى عمرها الرابع وكانت الفترة اللازمة لموت ٥٠% من الحشرات على النحو التالي ٧٦،٠٥ ساعة. ٧٢،٢ ساعة. ٧١،٣ ساعة على التوالي

بينما كانت ٧، ١١٨ ساعة فى حالة الباكولوفيروس الغير مهندس وراثيا وقد أثبت التحليل الإحصائي معنوية هذه النتائج.

أما عن الفيروس المهندس وراثيا والمحتوى على الجينات Aait, Aait 18, Aait 19 فكانت الفترة اللازمة لموت ٥٠% من حشرات ديدان الحرير عمر رابع هى ٥، ٩٣ ساعة. ٥٧، ٩٢ ساعة. ١٥، ٩٣ ساعة. على التوالي. هذا وقد أثبت التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين إضافة الجين الأصلي Aait وبين إضافة الجينات المطفرة Aait 19, Aait 18 ولكن هناك فروق معنوية بين إضافة هذه الجينات إلى الفيروس وبين تأثير الفيروس الغير مهندس وراثيا.

ثالثا: تأثير مبيد بيريثرويدى على يرقات ديدان اللوز الأمريكية: تم اختبار سمية المبيد البيريثرويدى fenvalerate على يرقات العمر الثالث لديدان اللوز الأمريكية Heliothis zea وكانت الجرعة المميتة ل ٥٠% من مجموع الحشرات ٠٫٠٠١٧ ميكروجرام لكل يرقة.

وأن كانت نتائج المبيدات الكيميائية أسرع تأثيرا إلا أن استخدام عناصر المكافحة الميكروبية للحشرات بصورتها التقليدية وتلك المهندسة وراثيا كانت فعالة وأكثر أمانا للبيئة ولصحة الإنسان ويمكن استخدامها في برامج المكافحة المتكاملة Integrated Pest Management بنجاح. وهندسة الميكروبات وراثيا يفتح مجالا أوسع فى استخدامها فى مجال مكافحة الحشرات وأيضا يتيح الفرصة لاستعمال سموم بروتينية أخرى فى هذا المجال.

٥- " كلونة وتوصيف جزيئى لجين جديد مسئول عن مقاومة الحشرات من عزلة معدية من بكتريا باسيلليس ثيرنجينسيس" للسيد/ صلاح على مصطفى للحصول على درجة الدكتوراه فى العلوم (نبات – ميكروبيولوجى) تحت أشراف أ.د. زينات كامل محمد ، أ.د. مجدى أحمد مدكور ، د. محمد سامى الأبيض عام ١٩٩٩.

بلايين الدولارات تفقد كل عام نتيجة تعرض المحاصيل الزراعية والغابات للإصابة بالآفات الحشرية وأيضا تعرض الإنسان للإصابة بالأمراض بواسطة الحشرات الناقلة للميكروبات. من المعروف أن مصادر الغذاء في العالم تعتمد على وجود وسيلة فعالة لحماية المحاصيل والحيوان والإنسان من الإصابة بالآفات الضارة. لقد كانت المبيدات الكيماوية أثناء العقدين الماضين ذو تأثير فاعل في القضاء على الآفات مما جذب الانتباه الى استخدامها في برامج المكافحة للآفات ولكن الاستخدام غير المدروس لهذه المبيدات أدى إلى تلوث البيئة من خلال تراكمها في التربة والماء والهواء والمنتجات الزراعية والحيوانية وهناك سبب أخر وهو تطور المقاومة الطبيعية في الحشرات لهذه المبيدات ما تسبب في عدم فاعلية هذه المبيدات الكيماوية في القضاء على هذا النوع من الحشرات المقاوم للمبيدات الكيماوية وأيضا قتل الكثير من الأعداء الطبيعية مما أدى إلى حدوث خلل في التوازن الحيوي. لقد ثبت أن استخدام المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية والفطرية هي الطريقة الأمنة لتجنب تلوث البيئة الناتج عن استخدام المبيدات الكيماوية. ومنذ أكثر من أربعين عام وبكتريا الباسيلليس ثيرنجنيس تستخدم كمبيد حيوي لمقاومة الآفات كبديل مناسب ومقبول لحماية البيئة من التلوث بالمبيدات الكيماوية.

مع مطلع هذا القرن أكتشف العالم أشياوتا (١٩٠١) نوع من البكتريا العصوية المتجرثمة لها القدرة على قتل يرقات دودة الحرير في اليابان وبعد مرور حوالي ١٥ عام تمكن عالم أخرى فى محافظة (ثيرنج) بألمانيا من أكتشف نوع أخر من هذه البكتريا ومنذ هذا التاريخ (١٩١٥) أطلق على هذا النوع من البكتريا أسم (باسيلليس ثيرنجينسيس) ثم توالت الأبحاث لاكتشاف تحت أنواع أخرى حتى أصبحت الآن حوالي ٤٥ تحت نوع (Bravo, 1997). تنتج هذه البكتريا بروتين سام للحشرات على هيئة بلورات أثناء تجرثمها له درجة عالية من التخصص حيث أثبتت الدراسات التى جرت عليها أنه لا يوجد لها تأثير على أى من الكائنات الحية الأخرى عدا أعدائها من الحشرات.

تقسم هذه البروتينات البلورية حسب تأثيرها على الحشرات الى حوالي ٦ أقسام رئيسية القسم الأول يقتل الحشرات الحرشفية الأجنحة فقط والقسم الثانى يقتل الحشرات

ثنائيـة الأجـنحة وحرشـفية الأجنحة القسم الثالث يقتل الحشرات غمدية الأجنحة، والقسم الـرابع يقـتل الحشـرات ثنائية الأجنحة، والقسم الخامس يقتل الحشرات غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة أما القسم السادس يقتل النيماتودا، ولقد أكتشف نوع أخر من البروتينات السـامة ينتج بواسطة هذه البكتريا فى مرحلة التكاثر الخضري له القدرة على التأثير على بعـض الحشرات من حرشفية الأجنحة ، المبيدات الحيوية التى تصنع من بكتريا باسيلليس ثيرنجنيسيس تشكل حوالي من ٩٠% الى ٩٥% من مجموع المبيعات العالمية من المبيدات الحيوية.

هـناك بعـض المشـاكل التى تحد من استخدام هذه البكتريا كمبيد حيوي منها أن البروتيـنات الـبلورية السامة المنتجة بواسطة هذه البكتريا تتكسر وتفقد سميتها بتعرضها لفـترات طويلة لضوء الشمس بواسطة الأشعة الفوق البنفسجية كما أن رشها على السطح العلـوي يعرضها للغسيل بواسطة قطرات الندى والأمطار كما أن معظم الحشرات تتغذى علـى السـطح السـفلي للأوراق. فكان الحل البديل هو استخدام تقنيات البيولوجيا الجزئية والهندسة الوراثية حيث أمكن كلونة الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين السام فى بكتريا أشريشـيا كولاى ودراسة التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين كمرحلة وسيطة ثم بعد ذلك دراسة إمكانـية التغير فى التركيب النيكلوتيدى لهذه الجين ليكون مناسبا لنقله الى النبات. وبالفعل تـم إنـتاج نباتات محوره وراثيا تحمل هذه الجين لها القدرة على إنتاج هذا البروتين السام بدرجـة تمكـنها مـن مقاومة الحشرات ومن مميزات هذه النباتات المحورة وراثيا أن لها القـدرة علـى توريـث الجين من جيل إلى أخر وبهذا يمكن التقليل أو عدم استخدام الرش المباشر بهذا المبيد الحيوي.

اسـتهدفت هـذه الدراسة إلى البحث عن عزلات جديدة وفريدة من بكتريا باسيلليس ثيرنجينسـيس عـن طـريق عـزل هذه البكتريا من يرقة دودة ورق القطن مصابة بهذه البكـتريا. ولقـد أظهرت العزلات المحلية كفاءة عالية فى قتل العديد من الحشرات التابعة لرتـبة حرشـفية الأجـنحة (مثل دودة اللوز القرنفلية – دودة ورقة القطن – ودودة حرير الخـروع) عند مقارنتها ببعض السلالات العالمية كالسلالة كروستاكى ، وبرلينر والستى ، وتولورثـى. لقد تم عزل وكلونة جين سام جديد من إحدى هذه العزلات المحلية المصرية لبكـتريا باسـيلليس ثيرانجنسيس Bacillus thuringiensis والتي أثبتت كفاءة عالية فى قـتل العديـد مـن الحشـرات التابعة لحرشفية الأجنحة عند مقارنتها بالعزلات المصرية الأخـرى وأيضـا السلالات العالمية ولقد أستخدم العديد من التقنيات لتعريف هذه العزلات

المصرية من البكتريا باسيلليس ثيرنجنسيس وكذلك عزل وكلونة الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين السام.

يمكــن تلخــيص الخطــوات التى أتبعت فى عزل وتعريف العزلات المصرية من بكتريا باســيلليس ثيرنجتسيس وكذلك عزل وكلونة الجين المسئول عن أنتاج هذا البروتين السام فيما يلي:

١. تــم عزل العزلات المحلية من بكتريا باسيلليس ثيرنجنسيس من يرقة دودة القطن مصابة بهذه البكتريا باستخدام طريقة (Travers, et al., 1987).
٢. تحلــيل محتوى البروتيني لكل من الخلايا الحضرية والمتجرثمة باستخدام طريقة SDS-PAGE للدراســة التشــابه والاخــتلاف بين هذه العزلات وأيضا مقارنتها بــبعض العــزلات العالمــية للبكــتريا الباســيلليس ثيرنجبنسيس مثل كروستاكى، تينبرويــنس ، وابزرايلنيسيس. ولقد وجد أن بعض الطرز البروتينية لهذه العزلات متشابه مع بعضها ولكن على الجانب الآخر مختلف تماما عن السلالات العالمية.
٣. تحلــيل ومقارنة المحتوى البلازميدى لكل من العزلات المحلية لدراسة الاختلافات الوراثــية لهــذه العزلات ولقد وجد أن المحتوى البلازميدى لكل من هذه العزلات مختلف بعضها عن بعض (Bron, 1990).
٤. اختلاف البصمات الوراثية لكل من المحتوى البلازميدى والمحتوى الكرموسومى لكل من العزلات المصرية عن بعضها البعض عند هضمها ببعض أنزيمات القطع المحــددة التى تقطع ال د . ن . أ. فى أجزاء معينة كما فى طريقة (Gill et al., 1985) مما يؤكد الاختلافات والتابين الوراثي بين هذه العزلات قيد الدراسة.
٥. استخدام التفاعل السلسلى للبولبميراز (Gleave et al., 1993 and Carozzi et al., 1991) لمعــرفة وجــود الجيــنات المسئولة عن إنتاج البروتينات السامة من عدمها. ولقد أوضحت النتائج أن كل العزلات المصرية تحتوى على جين البروتين الســام لرتــبة حرشفية الأجنحة وبعضها يحمل الجين المسئول من إنتاج البروتين المــزدوج التأثــير على كل من غمدية الأجنحة وحرشفية الأجنحة والبعض الأخر يحمل التأثير على كل من حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة.
٦. عزل وكلونة وتوصيف جزئي لجين سام جديد من العزلة المحلية SYI من خلايا مكتــبة وراثــية للمحــتوى البلازميدى للعزلة فى بكتريا أشريشيا كولاى باستخدام إحدى إنزيمات القطع المتخصصة والمحددة للمادة الوراثية د.ن. أ (HincII).

تمـــت دراسة هذا الجين باستفاضة حيث وجد أنه محمول على قطعة من ال د. ن. أ تـــتكون من ٣٨٥٩ قاعدة نيتروجينية حيث تم التأكد من كلونة هذا الجين بواسطة استخدام العديد من التقنيات التأكدية.

أ- تحديـــد التـــتابع النيكلوتيدى لهذا الجين السام باستخدام الطريقة الأنزيمية كما وصفها (Sanger et al., 1977) بواســـطة بادئات متخصصة على جانبي موقع الكلونة فى البلازمـــيد الحـــامل وأيضا استخدام بادئات متخصصة لهذا الجين السام وعمل تحت كلونـــة لهـــذا الجيـــن وذلـــك بتقطيع هذا الجين الى قطع أصغر وكلونة هذه القطع الصـــغيرة. تم بناء حوالي سبعة تحت كلون من هذا الجين للمساعدة فى إيجاد التتابع النيكلوتـــيدى لهذا الجين. ولقد تم تحديد التتابع النيكلوتيدى لهذا الجين بالكامل وأيضا تـــم تحديد نقطة بداية التعبير الجينى بواسطة الأحماض النووية الريبوسومية المختلفة والتـــي تترجم الشفرات الوراثية كما تم تحديد المواقع التى تتحكم فى تشغيل وتوقيف التعبير الجينى.

ب- وبمقارنـــة التتابع النيكلوتيدى للجين السام من العزلة المصرية بالجينات المعزولة من السلالات الأخرى والمتاحة فى البنك الجينى حتى ألان وجد أن هناك تشابه كبير بيـــن التـــتابع النيكلوتـــيدية لهذا الجين والتتابع النيكلوتيدى للجين السابق من السلالة كروستاكى أتش داى١ وايزوا حيث كانت درجة التشابه مع هذه الجينات حوالي ٩٥ % لقـــد تركـــزت معظـــم هـــذه الاخـــتلافات فى (Domain II) حيث يرتبط هذا (Domain II) بالمستقبلات فى المعى المتوسط للحشرات تمهيدا لقتلها. كما وجد أن حوالـــي ٢٧ حـــامض أمينـــي فى هذه المنطقة من البروتين السام مختلفة عن أقرب البروتينات المتشابه مما أدى إلى تغيير فى تركيب هذا البروتين وزيادة ظاهرة كرهه للمـــاء فـــى هـــذا الجزء من البروتين، وهذا تفسير للقدرة العالية على قتل الحشرات بواســـطتها عـــند مقارنـــتها بالعزلات العالمية. أوضح التحليل الدقيق النيكلوتيدى أن ٣٧٢٥ قاعـــة نيتروجينية تكون تركيب واحد مفتوح للجين السام وتبدأ من شفرة رقم واحـــد ATG وتنتهـــي عـــند رقم ٣٧٢٥ وهى الشفرة TAG. عند ترجمة الشفرة الوراثـــية لهـــذا الجين وجد أن البروتين الناتج له وزن جزيئى ٨، ١٣٣ كيلو دالتون ويتكون من ١١٧٦ حامض أميني.

ج- تـــم إنتاج البروتين السام للجين المكلون فى بكتريا أشريشيا كولاى بكفاءة عالية ولقد تـــم استخلاصـــه بطـــريقة (Hofte et al., 1986) وتـــم اختبار هذا البروتين فى الـــتفاعلات المناعية مع أجسام مضادة متخصصة ضد البروتينات السامة لحرشفيات

الأجـنحة المستخرجة من كل من السلالة الكروستاكى والسلالة برلينر وذلك بطريقة الانتشـار المـزدوج وأوضـحت الدراسة أن هناك تماثل مناعى عالي بين البروتين المعزول من السلالة المصرية وهذه البروتينات المعزولة من السلالات العالمية رغم الاختلافات الواضحة فى درجة السمية بينهم.

د- تـم دراسة فاعلية البروتين المنتج بواسطة بكتريا أشريشيا كولاى على حشرة دودة ورقة الطباق المقرنة ووجد أن ٢ نانو جرام من هذا البروتين لكل ١ سم^{٢} من الوسط الصـناعي الذي تتغذى عليه الحشرة تقضى على ٥٠% من الحشرات المستخدمة فى التجربة.

هـ - تـم تحديـد المسـتقبل Receptor لهذا البروتين السام بواسطة إجراء تجربة Ligand blot هـى عبارة عن تعليم هذا البروتين بذرة يود مشع ١٢٥ وقد وجد أن هذا البروتين يرتبط مع مستقبل بروتين فى الخملات المبطنة للمعى المتوسط للحشرة فـى دودة الطباق المقرنة وهذا المستقبل البروتيني له وزن جزيئي حوالي ٢١٠ كيلو دالتون.

ممـا سـبق يتضـح القدرة الفائقة للعزلات المحلية فى قتل الحشرات عند مقارنتها بالسـلالات العالمية مما يجعل هذه العزلات قابلة للاستخدام فى تصنيع المبيدات الحشرية لحمايـة البيـئة المحلـية مـن التلوث الكيميائي الناجم عن استخدام المبيدات الحشرية فى الـزراعة. وأيضا استخدام الجين المعزول فى إنتاج نباتات محورة وراثيا لها القدرة على مقاومة الحشرات.

٦- "تعظيم إنتاج سموم الباسيلليس ثيورنجنسيس" للسيد / أشرف فرج الباز حواس للحصول على درجة دكتوراه فى العلوم من كلية العلوم - جامعة الزقازيق تحت أشراف أ.د. مجدى أحمد عبد السلام مدكور ، أ.د. رجب محمد عبد العزيز ، أ.د. جيهان على الشربينى ١٩٩٩

لقد بدأ استخدام المبيدات الكيماوية بصورة واسعة فى القرن العشرين بعد نهاية الحرب العالمية الثانية وأخذ استهلاك هذه المبيدات فى التزايد حتى وصل الى معدل تجاوز ثلاثة ملايين طن فى عام ١٩٨٥، ونظرا لاستخدام هذه المبيدات الكيماوية بصورة غير منظمة وبطريقة عشوائية أدى ذلك إلى التأثير السلبي المباشر على الجنس البشرى، حيث أنه كل عام هناك ما يزيد على خمسة وعشرين مليون فلاح يصابون بحالات تسمم من جراء استخدامهم لهذه المبيدات، وكذلك أمتد الأثر إلى الأعداد الطبيعية للحشرات والتي بدأ عددها فى التناقص بصورة شديدة ، وكذلك أدى تنامي المناعة المكتسبة ضد هذه المبيدات الى عدم جدوى استخدامها إلا إذا كان ذلك بمعدلات عالية.

نظرا لما ظهر من أثر سيئ لاستخدام المبيدات الكيماوية فقد بدأ في الآونة الأخيرة الالتفات بصورة كبيرة الى استخدام المبيدات الحيوية على الرغم من اكتشافها فى أوائل القرن العشرين، وكان من أهم هذه المبيدات ذلك المبيد المستخرج من البكتيريا العصوية Bacillus thuringiensis والتي أكتسب شهرة واسعة لقدرتها على مكافحة الكثير من الآفات وخاصة الزراعية منها. وتتميز بكتيريا Bacillus thuringiensis بقدرتها على إنتاج بروتينيات بلورية الشكل أثناء عملية تجرثمها، وهذه البروتينات لها القدرة على قتل الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة.

نظرا لأهمية هذا المبيد الحيوي من الناحية الاقتصادية حيث أنه يشكل حوالي ١% من إجمالي مبيعات المبيدات عموما فى العالم فإن معظم الشركات العالمية اهتمت به وقامت بإنتاجه على المستوى الصناعي مثل شركة Abbott Lab. & Sandoz . وبالطبع اعتبرت الظروف المحيطة بعملية الإنتاج أحد أهم أسرار هذه الشركات ولذلك ندر النشر حولها حيث أنه من حوالي ٢٠٠٠ بحث تم نشرهم عن Bacillus thuringiensis فى الفترة من ١٩٨٠ - ١٩٩٠ لم يكن بينهم سوى أثنين وثلاثين بحثا تم نشرهم عن الإنتاج وظروفه.

استهدفت هذه الدراسة محاولة تقديم صورة مبسطة لطريقة إنتاج مبيد حيوي يعتمد أساسا على بكتيريا Bacillus thuringiensis بدءا من دراسة نوع بيئة النمو والخامات

المستخدمة ونسبة الكربون الى النتروجين وكذلك الظروف البيئية المختلفة وظروف ترسيب البروتينات البلورية المصاحبة للجراثيم. بعد ذلك تم إجراء تجربة نصف صناعية على مستوى مخمر سعة ٥٠٠ لتر ، وتم أخذ الناتج وأجريت عليه تجارب مختلفة بعدة تراكيب Formulations ، وذلك لاختبار أفضلها وتجريبها على المستوى الحقلي ضد دودة ورق القطن، وفى النهاية تم تجريب زيادة نسبة الخامات المستخدمة ومضاعفاتها وذلك لزيادة نسبة البروتينات البلورية المنتجة.

وقد اشتملت الدراسة على التجارب الآتية:

١- تعيين أفضل نسبة كربون/ نيتروجين لإنتاج البلورات البروتينية والجراثيم باستخدام الجلوكوز وطحين فول الصويا، وكانت أفضل النسب هي "١,٤٥، ٢,٤٠" ، حيث أعطت نسبة جراثيم ٧× ١٠^٩/ مللي ، وفشلت النسب الأخرى "٣,١٦، ٣,١٨، ٤,٧٥" فى إنتاج البلورات البروتينية والجراثيم.

٢- تعيين أفضل نسبة كربون / نيتروجين في إنتاج البلورات البروتينية والجراثيم باستخدام نشا الذرة وطحين فول الصويا ، وأعطت النسب المستخدمة كلها نتائج طيبة "٠,٧٥، ١,٠٠، ١,٣، ١,٥، ٢٥ ، ٢". وكانت أفضل النتائج لنسبة كربون / نيتروجين هى نسبة "٣، ١" حيث أعطت أعلى نسبة جراثيم ٩× ١٠^١٠ / مللي.

٣- تعيين أفضل مصدر كربوني باستخدام مصادر مختلفة "نشا الذرة – لاكتوز – سكروز – مولاس" وبنفس نسبة الكربون / نيتروجين "٣، ١" وكانت أفضل النتائج باستخدام نشا الذرة حيث أعطت أعلى نسبة من إنتاج الجراثيم ٧ ×١٠^١٠ / مللي.

٤- تعيين أفضل مصدر نيتروجين باستخدام مصادر مختلفة "طحن فول الصويا – يوريا – سلفات الأمونيوم – جلوتين الذرة" وبنفس نسبة الكربون/ نيتروجين "١,٣" ، وكانت أفضل النتائج باستخدام طحين فول الصويا ، حيث أعطت أعلى نسبة من إنتاج الجراثيم ٨÷ ١٠^١٠/ مللي.

٥- تعيين أفضل مصادر طحين فول الصويا من مصادر محلية وكذلك مستوردة ، وأعطت جميع الأنواع المستخدمة نتائج متقاربة جدا من حيث إنتاجية البلورات البروتينية والجراثيم.

٦- تعيين أفضل درجة حرارة تحضين لتنمية الكائن وإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية ، ووجد أن درجة الحرارة ٣٠° م هى أفضل درجات الحرارة المستخدمة.

٧- تعيين أفضل درجة أس هيدروجيني لتنمية الكائن وإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية، ووجد أن مستوى الأس الهيدروجيني ٧-٧,٥ يعطى أفضل إنتاجية من حيث كمية الجراثيم ٩× ١٠^١٠ / مللي.

٨- تعيين أفضل نسبة تلقيح للوسط الغذائي، ووجد أن نسبة تلقيح من ٤- ٦% تعطى أفضل النتائج (٦-٩ × ١٠^١١/ مللي).

٩- تعيين أفضل مستوى تهوية لإنتاج الجراثيم والبلورات البروتينية ، ووجد أن نسبة ٥٠ مللي "وسط غذائي" / ٥٠٠ مللي "حجم دورق" تعطى أعلى إنتاجية ٩×١٠^١١/ مللي ، ولذلك استخدمت نسبة ١٠٠ مللى / ٥٠٠ مللى لإعطائها أعلى نسبة إنتاجية كلية.

١٠-تعيين أفضل نوع مضاد للرغوة : "زيت ذرة – رودسيل سيليكون – سيجما " ٦٠٠٠" سيليكون – ستركتول ٦٧٠ غير سيليكونى" ، ووجد أن أفضل نوع له القدرة على تثبيط الرغاوى هو ستركتول ٦٧٠.

١١-تعيين أفضل تركيز من مادة فوسفات البوتاسيوم الثنائي القاعدية "١،٢،٣،٤،٥ جم/ لتر". ووجد أن أفضل تركيز هو ٥جم/لتر حيث أنه يعطى أعلى إنتاجية من الجراثيم ٦×١٠^١٠ / مللي.

١٢-تعيين أفضل تركيز من مادة كربونات الكالسيوم "١،٢،٣،٤،٥ جم / لتر" ، ووجد أن أفضل تركيز هو ٣جم / لتر حيث أنه أعطى نتائج متساوية مع التركيزات الأعلى ٤،٥ جم / لتر بعدد جراثيم ٥×١٠^١١ / مللى.

١٣- تعيين أفضل تركيز من مادة الخميرة المعالجة فى الوسط الحامضى والقاعدي وكذلك التى لم تعالج ، ووجد أن أفضل النتائج كانت باستخدام خميرة معالجة فى وسط قاعدي بنسبة ٥جم/ لتر حيث أعطت أعلى نسبة جراثيم ١١× ١٠^١٤/ مللي.

١٤- تعيين أفضل حامض أميني يمكن إضافته الى الوسط الغذائي ويؤدى إلى زيادة إنتاجية البلورات البروتينية والجراثيم ، ووجد أن حامض الجلوتاميك قد أعطى أفضل النتائج ٢/١٠^١٥ / مللي.

١٥-تعيين أفضل طرق فصل البلورات والجراثيم باستخدام تغيير قيمة الأس الهيدروجيني للوسط. وكذلك استخدام سلفات الأمونيوم والميثانول فى الترسيب،

وقد وجد أن الأس الهيدروجيني "٤,٥" هي أفضل قيمة لترسيب البروتينات البلورية ، وأن نسبة ٢٥% من سلفات الأمونيوم هي أفضل نسبة تؤدى إلى الترسيب الكامل للبروتينيات ، وأن أستخدام الميثانول بنسبة ١:١ هي أفضل نسبة تؤدى الى الفصل التام والتجفيف السريع للبلورات البروتينية والجراثيم.

١٦-تشـكيل عدد ثمانية تراكيب مختلفة لتشكيل المنتج في صورته النهائية ، ووجد أن التركيـبة رقـم "٧" هى أفضل التراكيب ، حيث أنها تعطى أفضل نسبة قتل لدودة ورق القطن.

١٧- مـن نتائج التجارب السابقة تم الوصول الى أفضل بيئة يمكن تطبيق نتائجها على مسـتوى المخمر النصف صناعي "٥٠٠ لتر" . وتم متابعة المؤشرات الآتية خلال مـراحل النمو المختلفة: الأس الهيدروجيني – نشاط إنزيم الأميليز – العد الكلى – عـدد الجراثيم الكلية – السكر الكلى – الوزن الجاف ، ووجد أن تنمية الكائن فى المخمـر تحت ظروف تشغيل محكمة من التهوية والتقليب أدت الى زيادة الإنتاجية الـى ٢٥جـم/ لتر من البروتينات البللورية والجراثيم. وقد تم تجريب ناتج المخمر باسـتخدام التركيـبة رقـم " V " ضد مركب " Dipel 2x“ باستخدام تركيزات مخـتلفة ، ووجـد أن تركيز ٥٠٠ جزء فى المليون من هذه التركيبة أعطى أفضل نـتائج ، كما تم حساب قيمة "جرعة قتل النصف " LC – 50 " والتي أعطت ١٠٠ جزء فى المليون.

١٨-تـم تجريـب نـاتج التجارب السابقة على المستوى الحقلي "٢ فدان" بمنطقة بلقاس بالدقهلية ، وكان معدل الاستخدام هو ٢٠٠ جم / فدان ثلاث مرات متتابعة بفاصل زمنـي عشـرة أيام ، وأظهرت النتائج التأثير الإيجابي للمنتج على مستوى فقص البيض والجيل الأول والثاني والثالث لدودة ورقة القطن.

١٩-دراسـة تأثير مضاعفة مكونات بيئة النمو K ”Lx, 1.5 x, 2x , 2.5 x, 3x“ ، ووجد أن نسبة ”2x“ أعطت أفضل النتائج.

٢٠-دراسـة تأثير استخدام مزيج من فول الصويا مع كل من سلفات الأمونيوم واليوريا كمصـادر متنوعة للنيتروجين ، ووجد أن استخدام فول الصويا بنسبة ٧,٥ جم مع سلفات الأمونيوم بنسبة ٠,٥٥ ، ٨ جم يعطى أفضل النتائج.

٧- دراسة بعنوان "زيادة فاعلية المبيدات الحيوية التي أساسها الباسيلليس ثوريخيبسيس لمكافحة دودة ورق القطن" للسيدة/ فاطمة ابو بكر عطا الله للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة- كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ١٩٩٩ تحت أشراف أ.د. أحمد عبد السلام بركات، أ.د. أحمد رؤوف حامد، أ.د. نبيل محفوظ إبراهيم.

تعتبر المبيدات الحيوية Bio-insecticides والتي تعتمد في تركيبها علي الميكروب الممرض للحشرات B. thuringiensis من الوسائل المناسبة والجيدة للاستخدام في إطار برامج المكافحة المتكاملة للآفات وذلك لما تتميز به من مواصفات وكونها أمنه بالنسبة للأنواع الأخرى من الحشرات غير المستهدفة في برامج المكافحة وغير ضارة بالحشرات النافعة وبقية الكائنات الأخرى بما فيها الإنسان، فضلا علي انها قابلة للخلط بالمبيدات الحيوية الأخرى الممرضة للحشرات، والمبيدات الكيماوية والمواد الإضافية، اللاصقة، المبللة، والناشرة.

بالرغم مما سبق من مميزات فانه لازالت هناك بعض المشاكل والأسئلة المرتبطة باستخدام تلك المبيدات الحيوية، خاصة عند الاستخدام الجوي، والحاجة الي انتقاء وتنمية سلالات من هذا الميكروب يكون لها قدرة تأثير كبيرة علي يرقات بعض أنواع حرشفية الأجنحة مثل الأنواع التابعة لجنس Heliothis وجنس Spodoptera. وعليه فزيادة فعالية المبيدات الحيوية التي تعتمد في تركيبها علي الميكروب B. thuringiensis أمر ضروري. ومن المعروف ان لهذا الميكروب فترة تأثير وبقاء قصيرة تحت الظروف الحقلية، كما أنه يؤثر كسم معوي ولابد أن تأخذه اليرقات مع الغذاء ليعطي تأثيره ولما كانت دودة ورق القطن تتغذى علي أوراق نباتات القطن، ومعظم محاصيل الحقل والخضر (ولا زالت ذات أهمية اقتصادية كبيرة في مصر لما تسببه من خسارة كبيرة للمحاصيل رغم الجهود المبذولة لمكافحتها)، فإنها تصبح بذلك هدف جيد للمكافحة باستخدام المبيدات الحيوية، ويصبح من الضروري بذل جهود كبيرة وتبني وسائل مختلفة لرفع كفاءتها ضد تلك الآفة.

تم خلال هذه الدراسة إتباع وسائل وطرق مختلفة لزيادة تأثير عدة مبيدات حيوية علي دودة ورق القطن نذكر منها الآتي:-

١-انتخاب المبيدات الحيوية ذات الكفاءة العالية والتي تسبب أعلي نسبة للموت بين اليرقات المعاملة بالإضافة الي الآثار الأخرى علي طوري العذراء والحشرة

الكاملة وذلك من بين المعروض تجاريا بالسوق العالمي للتوصية باستخدامها عند اللزوم.

٢-استخدام المبيدات الحيوية التي تم تطويرها عن طريق الهندسة الوراثية.

٣-إضـــافة بعــض الأملاح غير العضوية غير السامة الي المبيدات الحيوية لزيادة فعاليتها.

٤-إضـــافة تركيزات منخفضة من المبيدات الكيماوية مثل الميثومايل (methomyl) والســـيبرمثرين (cypermethrin) الـــي بعض المستحضرات الحيوية ودراسة تأثيرها علي الأعمار المختلفة لدودة ورق القطن.

٥-إضـــافة بعــض مستخلصات النيم مثل Neemix والـــ Agroneemللمبيدات الحيوية المختلفة في محاولة لزيادة تأثيرها.

٦-إضافة بعض المبيدات الحشرية ذات المصدر الطبيعي مثل الـــ Vertimec الي بعض المبيدات الحيوية.

٧-إضافة تركيزات مخفضة من محتويات المعدة الوسطي لليرقات العالية الحساسية للإصـــابة بالمـــيكروب B. thuringiensisمثل يرقات دودة الحرير الي بعض المستحضرات الحيوية تحت الاختبار لزيادة تأثيرها.

٨-بالإضـــافة الي ما سبق من دراسات تم إجراء دراسة علي تأثير المبيدات والمواد المختلفة المستخدمة علي نمو وتطور خلايا الميكروب B. thuringiensis عند تنميتها علي الاجار مغذي لمعرفة بعض الأثار الجانبية لعملية الإضافة إن الخلط إن وجدت.

كمـــا تم عمل تحليل الكتروفوريزيس electrophoresis لمحتويات المعدة من البروتيـــنات لكـــل مـــن الـــيرقات المعاملة والغير معاملة لأحد أنواع الحشرات العالية الحساسية للإصابة (دودة الحرير)، ولأحد أنواع الحشرات المتوسطة الحساسية للإصابة (دودة ورق القطـــن) وأخـــري لأحـــد أنواع الحشرات القليلة الحساسية للإصابة (الدودة القارضـــة)، بالإضـــافة الـــي إجراء نفس التحليل علي المكون البروتيني للإندوتوكسين Endotoxin الخاص بالميكروب B. thuringiensis.

<u>ويمكن تلخيص النتائج الهامة ذات القيمة التطبيقية التي أمكن التوصل اليها فيما يلي:</u>

١- للمبيدات الحيوية التي تم اختبارها وهي Dipel 2X, Dipel ES/NT, Ecotech-Bio, Delfin, MVPII تأثـــير قـــوي علي يرقات العمرين الثاني والرابع لدودة

ورق القطـــن غير أن يرقات العمر الثاني كانت أكثر حساسية. هذا ويمكن ترتيب المستحضرات الحيوية بناء علي التركيز الذي يقتل ٥٠ ٪ من اليرقات بعد ٧ أيام من المعاملة كالاتي:-

المستحضر الحيوي	LC_{50}
a- MVPII	0.26 ml/L
b- Dipel ES/NT	0.34 ml/L
c- Dipel 2X	0.41 gl/L
d- Ecotech-Bio	0.73 gl/L
e- Delfin	1.2 gl/L

بالإضـــافة الـــي تقدير النسبة المئوية للموت علي الطورين الثاني والرابع حتـــي ١٤ يومـــا من تاريخ بدء المعاملة، فقد تم ايضا تقدير تأثير المستحضرات الحـــيوية علـــي النســـبة المـــئوية للتعذير ووزن العذاري والنسبة المئوية للتشوه الحـــادث بها والنسبة المئوية لخروج الفراشات والنسبة المئوية للتشوه الحادث بها لإعطـــاء صـــورة كاملة عن التأثيرات المباشرة وغير المباشرة للمبيدات الحيوية علي دودة ورق القطن في أطوارها المختلفة.

٢- فـــي كل المعاملات التي استخدمت فيها المبيدات الحيوية السابقة الذكر ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن حدث انخفاض في النسبة المئوية للتعذير، ومتوسط وزن العـــذاري، والنســـبة المـــئوية لخـــروج الفراشات، وزيادة في النسبة المئوية للتشوهات بالعذاري والفراشات الناتجة عنها.

٣- ثبـــت أن المبـــيد الحيوي MVPII أقوي المبيدات التي تم تجريبها، وقد تم تطويره عـــن طـــريق الهندســـة الوراثية بنظام (cell cap system) أي أن بللورات السم الداخلـــي للمـــيكروب Endotoxin of B. thuringiensis يـــتم تخلـــيقه داخل ميكروب أخر ممرض للحشرات وهي Pseudomonas flurescens وذلك بهدف حمايته من الظروف البيئية عند الاستعمال عن طريق غلاف البكتريا المحيطة به.

٤- إضـــافة بعـــض الأملاح غير العضوية وغير السامة الي المبيدات الحيوية زاد من فعاليـــتها، فعـــند إضافة كل من كبريتات الزنك بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر او كربونات الصـــوديوم بتركيز ٠,١٢٥ جم/لتر او كربونات البوتاسيوم ٠,٣٧٥ جم/لتر زادت مـــن فعالية المبيد Dipel 2X ضد يرقات العمر الثاني وسجلت حالات من تنشيط

الفعالــية (Synergistic effect)بلغت قيمتها ١٠,٨، ١٠,٢، ٣,١ أضعاف تأثير الـــ Dipel 2X عند استخدامه بمفرده. أما في حالة يرقات العمر الرابع فقد كان التأثير أقل.

٥- أدي ايضـــا إضـــافة الأمـــلاح غـــير العضـــوية السابقة الذكر الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio الي زيادة فعاليته ضد يرقات العمر الثاني.

٦- أمكـــن زيادة فعالية المبيدات الحيوية بإضافة تركيزات منخفضة من بعض المبيدات الكيماوية وأدي البعض منها الي تأثير مثبط كما يلي:-

أ)وجـــد تأثـــير مثـــبط عـــند إضـــافة الميثومايل methomyl (مجموعة الكربمات Carbamate group) الـــي المبـــيد الحيوي Dipel 2X، وقد تراوحت قيمة الـــ Co-toxicity factor مـــن ٣١,٤-٥١,٠ وعلـــيه فـــإن إضـــافة الميثومايل الي مستحضرات الميكروب B. thuringiensis غير مرغوب فيها.

ب) أدي إضـــافة المبـــيد الكـــيماوي السيبرمثرين cypermethrin (من مجموعة Pyrethroid group) بتركيزاته المختلفة (١,١٧، ٢,٣٤، ٤,٦٨، ٩,٣٧، ١٨,٧٥، ٣٧,٥ جـــزء مـــن المليون) الي المبيد الحيوي Dipel 2X الي وجود زيادة في فعالـــية بدرجات مختلفة بين التنشيط والإضافة (Synergistic, potentition or additive effects)وذلك ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن.

ج) ســـجلت أعلـــي نسبة لزيادة الفاعلية عند إستخدام خليط يتكون من السيبرمثرين بتركـــيز ٤,٦٨ جزء في المليون و Dipel 2X بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر وأقل درجة من التنشيط عند استخدام خليط منهما بتركيز Cypermethrin (١,١٧ جزء في المليون) وdipel 2X (٠,٢٥ او ٠,٥ جرام/لتر).

د) أوضـــحت الخلائـــط المســـتخدمة مـــن كل من السيبرمثرين والـــ Dipel 2X بتركيزاتها المختلفة تأثير مثبط علي كل من تكوين العذاري ومتوسط وزن العذاري الخارجة من اليرقات العمر الرابع المعاملة وكذلك نسبة خروج الفراشات، كما أدت الـــي زيادة نسبة التشوهات بالعذاري والفراشات، مما يؤثر علي تعداد الحشرة في الأجيال التالية.

٧- عـــند إضافة تركيزات منخفضة من الـــ Neemix (مستخلص من النيم) الي المبيد الحـــيوي Dipel 2X أو المبـــيد الحيوي Ecotech-Bio أدي ذلك الي زيادة في النســـبة المـــئوية لموت يرقات العمر الثاني ويمكن وصفها بأنها تأثير تكميلي an

additive effect بيـنما أدت التركـيزات العالـية مـنه الي حدوث تأثير مثبط antagonistic effect .

٨- عـند إضـافة تركيزين قدرهما ٥٠ و ١٠ جم/لتر من الـ Neemix الي Dipel 2X بتركـيزات ١,٠، ٠,٥، ٠,٢٥، ٠,١٢٥ جم/لتر حدث تأثير تكميلي وعند زيادة تركيز الـ Neemix الي ٢٠ مل/لتر حدث تأثير مثبط.

٩ـ يمكـن استخدام الخلائط من الـ Dipel 2X بتركيزات ١,٠، ٠,٥، ٠,٢٥، ٠,١٢٥ جـم/لتر مع الـ Neemix بتركيزات ٢٠، ١٠، ٥مل/لتر ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن بنجاح حيث ارتفعت نسبة الموت وأعلي تأثير تكميلي (aditive) او مقـوي (potention) كمـا تأثـر بشدة تكوين العذاري ووزنها، ونسبة خروج الفراشـات، وربما يعود ذلك الي التغيرات الفسيولوجية الكثيرة التي تحدث بيرقات دودة ورق القطـن في أعمارها الأخيرة قبيل التعذير. وعليه فيمكن استخدام خلائط الـ Neemix مـع المبيد الحيوي Dipel 2X بنجاح ضد يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن.

١٠- أدت إضـافة الـ Neemix بتركـيزات ١٠، ٥ مـل/لـتر الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio بتركـيزات ٥,٠، ٢,٥، ١,٢٥ جـم/لتر الي زيادة في الفاعلية ضد يـرقات العمـر الثاني يمكن وصفها بأنها potentition أو additive بينما عند زيادة تركيز الـ Neemix الي ٢٠ مل/لتر أدي ذلك الي وجود تأثير مثبط.

١١- فـي كل حالات استخدام خلائط من الـ Neemix مع أي من المبيدين Dipel 2X, Ecotech-Bio ضـد يـرقات العمر الرابع ادي ذلك الي خفض في النسبة المـئوية للتعذير، متوسط وزن العذاري، والنسبة المئوية لخروج الفراشات، وزيادة التشوهات بالعذاري والفراشات الناشئة.

١٢- بلغت النسبة المئوية للتشوه لعذاري ١٠٠% عند معاملة يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن بالأجرونيم Agroneem بتركيز قدره ٥ مل/لتر.

١٣- أدي إضـافة مبـيد الأجرونـيم Agroneem بتركيزات قدرها ٥، ٢,٥ مل/لتر تركيزات مختلفة من المبيد الحيوي Dipel.2X بتركيزاته المختلفة ٠,٢٥، ٠,١٢٥، ٠,٥، ١,٠ جـم/لـتر واسـتخدامه ضد كل من يرقات العمرين الثاني والرابع الي حـدوث تأثـير مثـبط (antagonistic effect) ويتكرر ذلك مع المبيد الحيوي

Ecotech-Bio ولذلـك لا ينصح بإضافة الـ Agroneem الي المبيدات الحيوية لمكافحة الأعمار اليرقية.

١٤- رغم التأثير المثبط للمبيد Agroneem علي كل من المبيد الحيوي Dipel 2X، والمبـيد الحـيوي Ecotech Bio إلا أنـه أدى الي انخفاض ملحوظ في النسبة المئوية لتكوين العذاري، وانخفاض متوسط وزن العذاري، وانخفاض النسبة المئوية لخـروج الفراشـات، كما أدي الي زيادة النسبة المئوية لتشوه العذاري والفراشات الناتجة عن معاملة يرقات العمر الرابع.

١٥- أمكـن زيـادة فاعلـية المبيدات الحيوية Dipel 2X, Ecotech –Bio بإضافة تركـيزات مختلفة من المبيد Vertimec الي تركيزات مختلفة واستخدامها لمعاملة يرقات العمرين الثاني والرابع.. كما يلي:

أ) عـند استخدام خلائط من الـ Dipel 2X (بتركيزات مختلفة ٠,٢٥،٠,٥،١,٠ جم/لتر) والـ Vertimec(بتركيزات مختلفة ٠,٢٥، ٠,٥، ١,٠ جم/لتر) لمعاملة يـرقات العمريـن الثانـي والرابع سجلت تأثيرات منشطة له في كل المعاملات Synergistic effect تم تقديرها حسابيا وتراوحت قيمتها بين ١,٠ و ٣,٤ ولم يحـدث تأثير منشط في حالتين فقط وذلك عند استخدام خليط مكون من Dipel 2X (٠,٢٥ جـم/لتر) و Vertimec بتركيزات قدرها ٠,٢٥، ٠,٥،١,٠ مل/لتر لمعاملة العمر الثاني لدودة ورق القطن.

ب) وجـد ايضـا تأثـير منشط (Synergistic effect) للمبيد Vertimec عند خلطـه بتركـيزات ٠,٥،١,٠ مل/لتر مع المبيد الحيوي Ecotech-Bio بتركيز قدره ١,٢٥ جم/لتر واستخدمت لمعاملة يرقات العمر الثاني.

ج) مـن الأهمـية بمكان تقرير ان خلائط الـ Vertimec مع المبيدين الحيويين Dipel 2X, Ecotech-Bio ادي فـي جميع الحالات الي خفض النسبة المئوية للـتعذير، والنسـبة المـئوية لتشوه العذاري والفراشات، فعلي سبيل المثال بلغت النسـبة المـئوية للـتعذير الناشـئة من يرقات العمر الرابع غير المعاملة ٩٢% وتراوحـت بيـن ٤٠-٦١% فقـط عند معاملة يرقات العمر الرابع بخلائط من Vertimec , Ecotech-Bio. وعلـيه فان زيادة النسبة المئوية للموت باليرقات فـي الأعمـار المختلفة والتأثيرات الجانبية علي طوري العذراء والفراشات تؤكد

إمكانية التوصية بإضافته الي المبيدات الحيوية لزيادة فعاليتها لمكافحة دودة ورق القطن خاصة وأن الـ Vertimecغير ضار بالحشرات النافعة.

١٦- ثبت من التجارب خلال هذا البحث ان محتويات المعدة الوسطي midgut contents للبرقات الغير معاملة من الأنواع عالية الحساسية للإصابة بالميكروب B. thuringiensis مثل ديدان الحرير B. mori تزيد من فاعلية المبيدات الحيوية عند إضافتها إليها بتركيزات منخفضة واستخدامها في معاملة يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن. وعلي سبيل المثال، بلغت النسبة المئوية للموت بيرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن. وعلي سبيل المثال، بلغت النسبة المئوية للموت بيرقات العمر الثاني بعد ٧ ايام من تغذيتها علي نباتات قطن معملة بالمبيد الحيوي Dipel 2X بتركيز ١,٠ جم/لتر (٥٨,٦%)، وارتفعت تلك النسبة الي (٨٠,٦%) عند إضافة محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير في عمرها الخامس الي المبيد الحيوي Dipel 2X.

١٧- سجلت ١٧ حالة من حالات Synergistic effect من ٢٠ معاملة مختلفة بتركيزات مختلفة لخلائط من محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير والمبيد الحيوي Dipel 2X وتراوح قيمة Synergistic factor بين ١,٠-٢,٧.

١٨- حدث تأثير منشط ايضا لإضافة محتويات المعدة الوسطي لديدان الحرير الغير معاملة الي المبيد الحيوي Ecotech-Bio وسجلت ٧ حالات للتأثير المنشط من بين ١٥ معاملة مختلفة.

١٩- في دراسات مكملة لما سبق اختبار تأثير المواد والمبيدات السابق إضافتها الي المبيدات الحيوية بغرض زيادة تأثيرها، علي نمو الخلايا البكترية للميكروب B. thuringiensis علي الاجار المغذي وجد الاتي:-

أ) تؤخر سلفات الزنك نمو الميكروب عند استخدامها بتركيز ٠,٢٥ جم/لتر للبيئة المغذية.

ب) لا يوجد مثبط لكل من كربونات الصوديوم ١,٢٥ جم/لتر أو كربونات البوتاسيوم ٠,٣٧٥ جم/لتر.

ت) ليس للمبيد الكيماوي cypermethrin أي تأثير مثبط علي نمو الميكروب علي بيئة الاجار مغذي.

ث) أدي المبيد الكربماتي الميثومايل methomyl الي حدوث تثبيط لنمو الميكروب علي سطح اجار المغذي.

ج) لـــيس لكـــل من مستخلصات النيم Neemix, Agroneem أية تأثيرات مثبطة علي نمو الميكروب.

ح) ليس لمبيد الـــ Vertimec تأثير مثبط علي نمو الميكروب.

وفي ضوء النتائج السابقة يمكن التوصية بإضافة أي من المبيدات أو المواد التي ثبـــت أنها تزيد من فاعلية المبيدات الحيوية التي تم تجريبها فيما عدا (علي سبيل الحذر الميثومايل) مع ملاحظة أن مستحضرات الميكروب B. thuringiensisسواء في شكل معلقـــات أو مساحيق قابلة للبلل لا تحتوي علي خلايا خضرية للميكروب وإنما تحتوي جراثـــيم المـــيكروب، وبللـــورات الاندوتوكسين وكلاهما لا يتأثر بالمبيدات فضلا علي استخدامه مباشرة علي النبات لا يعطي فرصة للإنبات الجراثيم قبل الاستخدام.

٢٠- نتائج تحليل الـــ electrophoresis لبروتينات محتويات المعدة الوسطي ليرقات معاملـــة وغـــير معاملـــة مـــن الأنواع العالية الحساسية للإصابة بالميكروب B. thuringiensis (مـــثل دودة الحريـــر) والمتوســـطة (دودة ورق القطن) والقليلة الحساســـية (مـــثل الـــدودة القارضـــة)، وكذلك تحليل المكون البروتيني لبللورات الاندوتوكســـين Endotoxin –crystal للمـــيكروب تثبت لنا أن المعدة الوسطي للـــيرقات خاصـــة ذات الـــوزن الجزيئـــي القلـــيل عن اليرقات المتوسطة أو قليلة الحساســـية للإصـــابة. وأنـــه قـــد حـــدث انخفاض في كمية البروتينات التي تمثل البروتيـــنات المكونـــة لـــبللورات الاندوتوكسين بعد المعاملة بصورة واضحة في اليرقات الحساسة تليها المتوسطة ثم القليلة الحساسية للإصابة بالميكروب مما يفسر امتصاصـــها أو نفاذهـــا خـــلال جدار المعدة الوسطي مما يسرع من حدوث عملية الشـــلل بـــالمعدة الوسطي ثم موت اليرقات بعد ذلك طبقا للأعراض المعروفة عند الإصابة.

وتمـــثل النتائج المتحصل عليها من خلال تلك الدراسات والتجارب قيمة تطبيقية عالـــية ويمكـــن الاســـتفادة بها في برامج المكافحة المتكاملة لمكافحة دودة ورق القطن بالمبـــيدات الحـــيوية فضلا عن إعطاء كثير من المعلومات الخاصة بالعلاقة بين المواد المضـــافة لـــزيادة الفاعلية ونمو الميكروب، والفروق من المكون البروتيني لمحتويات المعـــدة الوســـطي للـــيرقات الحساسة والأقل حساسية وماذا يحدث بعد المعاملة بالمبيد الحيوي.

٨- دراســة بعــنوان "دراســات عل عزلات مختلفة من التربة المصرية للباسيللوس ثوريخينسيز وفاعليتها ضد دودة ورق القطن سبودوبترا ليتوراليس" للباحثة/ نجلاء عطا الله مهني عمر كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ١٩٩٩.

يعتــبر ميكروب Bacillus thuringiensis من أهم الكائنات التي تم استخدامها بنجاح وعلي نطاق واسع ضمن برامج المكافحة المتكاملة للآفات في السنوات الأخيرة، لمــا يتميز به من تخصص شديد وفعالية عالية تجاه آفات محددة بالإضافة إلى مستوي الأمــان المرتفع تجاه العديد من الحشرات النافعة والكائنات الأخرى (Swirski et al. 1988) ولذلــك فــان استخدامه كبديل للمبيدات الكيماوية والتي تؤثر تأثيرا سلبيا علي مخــتلف مظاهــر الحــياة يساهم في الحفاظ علي البيئة من التلوث وعدم تكوين الآفات مقاومة ضده (Sneh and Schuster, 1983).

نظرا لأهمية هذا الميكروب في مجال المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية تقوم الــدول المتقدمة وبعض من الدول النامية بإنتاج هذا الميكروب في مستحضرات تجارية يــتم تســويقها عالمــيا، وتستورد مصر كميات منه لمكافحة بعض الآفات، مثلها كدول أخــرى، واســتيراد هــذه المستحضرات يحمل ميزانيات هذه الدول قدرا من العملات الصــعبة، لذلك اتجهت بعض الدول مثل الهند ودول شرق آسيا وجنوب أفريقيا ومصر وغــيرها مــن الــدول النامية إلى استكشاف ثرواتها الطبيعية من هذا الميكروب النافع لاستغلاله في مكافحة الآفات الحشرية.

تهدف الدراسة الحالية لاستكشاف عزلات لهذا الميكروب من عدد من المحافظات فــي مصر بهدف تقويمها من نواحي عدة تخدم في مكافحة دودة ورق القطن ويتضمن برنامج الدراسة الحالية النقاط التالية:

١. الحصــول علــي عزلات لميكروب B. thuringiensis من مواقع مختلفة في مصر.
٢. اختــبار فعالــية تلــك العــزلات ضــد يــرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن Spodoptera littoralis علــي البرســيم باعتباره محصولا ذا أهمية اقتصادية ولا يحتوي علي مواد ذات تأثير مثبط علي ميكروب .B.t.
٣. اختــبار الســلالات الأكــثر فعالية علي كل من البرسيم والخروع لإيضاح تأثير اختلاف أوراق العائل النباتي علي فعالية الميكروب المختبر.
٤. اختــبار فعالية العزلات المتحصل عليها من التربة المصرية علي بيئة صناعية، لتلافي تأثير اختلاف أوراق العوائل النباتية المختلفة.

٥. دراســـة منحنــي النمو للعزلات التي أعطت أعلي نسب أماته ضد الحشرة علي البيئة الصناعية لمعرفة أفضل وقت لحصاد جراثيم تلك العزلات في حالة إنتاجها علي نطاق أوسع لاستخدامها في المكافحة.

وقد أوضحت الدراسة الأتي:

١) تم الحصول علي ١٣ عزلة لميكروب .B.t من عينات التربة التي تم جمعها من ٧ محافظـــات مخـــتلفة في مصر حيث تم التعرف علي هذه العزلات عن طريق الصـــفات المزرعـــية والفحـــص الميكروســـكوبي بالإضـــافة إلـــى الاختبارات البيوكيميائية.

٢) تـــم إنتاج عزلات .B.t المتحصل عليها علي بيئة Nutrient agar في المعمل للحصـــول علـــي معلـــق الجراثـــيم والبلورات لكل منها لاستخدامه في التجارب الخاصـــة بـــتقدير مدي فعالية تلك العزلات تجاه الحشرة المستهدفة في الاختبار (دودة ورق القطن S. Littoralis).

٣) أظهرت نتائج اختبار فعالية عزلات الـــ B.T المتحصل عليه ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن علي نبات البرسيم باستخدام تركيز واحد وهو (٥١٢ x ١٠^٦ جـــرثومة/مللـــي) أن تلـــك العزلات اختلفت في مدي فعاليتها تجاه الحشرة المســـتهدفة حيـــث قسمت تلك العزلات وفقا لدرجة فعاليتها الي **ثلاثة مستويات كالاتي:-**

- عزلات فعالة وَالتي أحدثت نسبة موت أعلي من ٤٤٪ وتضمنت ثلاث عزلات هي:-
- GH-I (٥٣,٣٪)، DK-2 (٥٠٪)، GH-2 (٤٦,٦٪)
- عـــزلات متوســـطة الفعالية والتي أحدثت نسبة موت تراوحت بين ٢٥-٤٤٪ وتضمنت عزلة واحدة هي KF-2 (٢٦,٦٪).
- عـــزلات منخفضة الفعالية والتي أحدثت نسبة موت أقل من ٢٥ ٪ وتضمنت ٩ عزلات :-

KF-1 (٢٣,٣٪)، DK-1 (٢٠ ٪)، MN-2 ، SH-2 (١٣,٣٪)، SH-1 (١٠٪)، KL-1 (٩,٩٪)، DK-3 (٦,٧٪)، MN-1 (٣,٣٪).

٣-١. اختبرت أكثر السلالات فعالية والتي سببت نسبة موت أعلي من ٤٤ ٪ علي كل مـن البرسـيم والخروع باستخدام ٥ تركيزات مختلفة هي: ١٢٨، ٢٥٦، ٥١٢، ١٠٢٤، ٢٠٤٨ x ١٠ ٦ جـرثومة/مللـي ضد يرقات العمر الثاني لنفس الحشرة المختبرة وأوضحت النتائج ما يلي:-

العـزلة GH-1 وهي من محافظة الغربية أحدثت نسبة موت قدرها ٣٠,١ ٪ علـي ٣ ٪ عند تركيز ٢١٨ x ١٠ ٦، ٥٣,٣ ٪ عند تركيز ٥١٢ x ١٠ ٦، ٥٦,٦ ٪ عـند تركـيز ١٠٢٤ x ١٠ ٦ بينما انخفضت الي ٤٣,٣ ٪ عندما زاد التركيز الي ٢٠٤٨ x ١٠ ٦ جرثومة ٪ مللي وذلك مقارنة بنسب موت متذبذبة علـي الخروع بزيادة التركيز المستخدم، حيث زادت الي ٥٣,٤ ٪ عند ٢٥٦ x ١٠ ٦ ثـم انخفضت الي ٢٩,٩ ٪ عند التركيز ٥١٢ x ١٠ ٦ ثم عادت للزيادة مـرة أخـري ووصلت الي ٥٣,٣ ٪ علي تركيز ١٠٢٤ x ١٠ ٦منتهية بنسبة موت ٣٦,٣ ٪ عند أعلي تركيز.

العزلة GH-2 أحدثت نسبة موت متساوية علي كل من الخروع والبرسيم (٣٦,٦ ٪) علـي تركـيز ١٢٨ x ١٠ ٦، بـزيادة التركيز الي ٢٥٦ x ١٠ ٦ لم تحـدث زيادة مقابلة في نسبة الموت علي البرسيم بينما علي الخروع ازدادت إلى ٤٣,٣ ٪ ثـم تزايدت نسبة الموت علي البرسيم بزيادة التركيز حتى وصلت إلى ٧٦,٦ ٪ عند أعلي تركيز مع ملاحظة أن زيادة التركيز من ٥١٢ x ١٠ ٦ الي ١٠٢٤x١٠ ٦ لـم يحـدث أي زيادة في نسبة الموت علي التركيز ٥١٢ x١٠ ٦. علـي الجانـب الاخـر كانـت نسبة الموت علي الخروع متذبذبة التركيز حيث انخفضـت الي ٢٣,٢ ٪علي التركيز ٥١٢ x ١٠ ٦ ثم عادت للزيادة الي ٤٦,٦ ٪ عـند أعلـي تركـيز. العزلة DK-2 أحدثت نسبة موت مرتفعة علي التركيز الأول (١٢٨ x ١٠ ٦) مقارنـة بالعزلتين السابقتين حيث كانت ٤٣,٣ ٪ علي البرسـيم، ٥٠ ٪ علـي الخـروع ثـم تزايدت نسبة الموت الي ٧٦,٨ ٪ علي البرسـيم، ٥٦,٨ ٪ علـي الخروع بزيادة التركيز الي ٢٥٦ x ١٠ ٦ ثم تذبذبت نسـبة الموت علي كلا النباتين انخفاضا وارتفاعا بزيادة التركيزات حتى وصلت الي ٢٠ ٪ علي البرسيم ٤٣,٣ ٪ علي الخروع عند أعلي تركيز مستخدم.

٣-٢. أجـري اختبار فعالية أخر لعزلات .B.t ضد يرقات العمر الثاني لنفس الحشرة المختـبرة باسـتبدال النـباتات الطبيعية المستخدمة في الاختبارات السابقة ببيئة صـناعية علـي تركيز ١ x $١٠^{٧}$ جرثومة/مللي وقد أظهرت نتائج هذا الاختبار اخـتلاف فـي فعالية العزلات ضد الحشرة المختبرة حيث تروا حت نسبة الموت الحادثة بين ١٠ ٪، ١٠٠ ٪ وذلك في اليوم السابع بعد المعاملة.

٣-٣. مـن نـتائج الاختبار السابق انتخبت السلالات الأكثر فعالية والتي أحدثت نسبة مـوت أعلـي من ٨٥ ٪ وهي DK-2، DK-3، KF-1 (جميعها أحدثت نسبة مـوت ١٠٠٪) لـتقدير فعاليتها ضد يرقات العمر الثاني لدودة ورق القطن علي البيئة الصناعية باستخدام ٧ تركيزات هي : ١ x $١٠^{٣}$ ،١ x $١٠^{٤}$ ، ١ x $١٠^{٥}$ ، ٥ x $١٠^{٥}$ ، ١ x $١٠^{٦}$ ، ٥ x $١٠^{٦}$ ، ١ x $١٠^{٧}$ جـرثومة/مللـي بيئة صناعية **وقد أظهرت النتائج ما يلي:-**

أولا: العـزلة DK-2 أحدثـت نسـبة موت قدرها ٣,٣ ٪ في اليوم السابع علي التركيز ١ x $١٠^{٣}$ وتزايدت هذه النسبة بزيادة التركيز حتى وصلت الي ٨٩,٩ ٪عند التركيز ٥ x $١٠^{٦}$ بينما انخفضت الي ٨٣,٤ ٪ بزيادة التركيز الي ١ x $١٠^{٧}$ مع ملاحظة أن هذه النسبة قد انخفضت عن نسبة الموت الناتجة عند نفس التركيز في اختبار المفاضلة بين العزلات.

ثانـيا: العـزلة DK-3 أحدثـت نسبة موت قدرها ٦,٧ ٪ في اليوم السابع علي التركـيز (١ x $١٠^{٣}$) والثانـي (١ x $١٠^{٤}$) ثم تزايدت هذه النسبة بزيادة التركيز المستخدم حتى وصلت الي ٩٣,٣٪ موت عند أعلي التركيز ١ x $١٠^{٧}$ حيـث لوحـظ ايضـا ان هذه النسبة انخفضت بفارق ٠,٧٪ عند استخدام نفس التركيز في اختبار المفاضلة بين العزلات حيث كانت ١٠٠ ٪.

ثالـثا: العـزلة KF-1 أحدثـت نسبة موت قدرها ٦,٧ ٪ في اليوم السابع علي التركيز الأول (١ x $١٠^{٣}$) والثاني (١ x $١٠^{٤}$) ثم تزايدت هذه النسبة الي ٣٣,٤ ٪ بـزيادة التركـيز الي ١ x $١٠^{٥}$ متشابه بذلك مع نسبة الموت التي أحدثـتها العـزلة DK-3 علـي التركيزات الثلاث الأولي، بينما تزايدت نسبة الموت بعد ذلك بزيادة التركيز المستخدم حتي وصلت الي ١٠٠ ٪ علي أعلي تركيز مستخدم (١ x $١٠^{٧}$ جرثومة/مللي).

٤) تم عمل منحنى النمو لأكثر العزلات فعالية والناتجة من اختبار المفاضلة بين العزلات علي البيئة الصناعية وهي العزلات KF-1، DK-3 وقد أوضحت تلك الدراسة ما يلي:-

أولا: بالنسبة للعزلة KF-1 أعطت معدلات نمو متوازية من الخلايا الخضرية حتي وصلت لأقصي عدد من الخلايا الخضرية وهو ١١٦ x ١٠ ^٦ خلية/مللي بعد ٣٦ ساعة عند درجة pH ٧,٧٩، بينما أعطت أعلي عدد من الجراثيم وهو x١٣٨,٨ ١٠ ^٦ جرثومة/مللي بعد ٨٤ ساعة عند درجة pH ٩ وبالتالي يمكن الحصول علي أقصي عدد من الجراثيم الخاصة بتلك العزلة بعد مرور ٨٤ ساعة من التلقيح (inoculation) تحت نفس الظروف الموضحة بالاختبار.

ثانيا: بالنسبة للعزلة KF-2 فقد تشابهت مع العزلة السابقة من حيث الأزمنة التي عندها وصلت كلا من الخلايا الخضرية والجراثيم أقصي عدد لها ولكنها اختلفت عن العزلة السابقة في تلك الأعداد، حيث كان أعلي عدد من الخلايا الخضرية لتلك العزلة هو ١٣٢,٧ x ١٠ ^٦ خلية/مللي بعد ٣٦ ساعة بينما كان أعلي عدد للجراثيم هو ١٧٢,٣جرثومة/مللي بعد ٨٤ ساعة وهو الزمن المناسب لحصاد جراثيم تلك العزلة عند الانتاج. وقد لوحظ ايضا ان العزلة DK-2 تعتبر أكثر انتاجا للجراثيم من العزلة KF-1 حيث أنها أعطت عددا أكبر من الجراثيم وهو ١٧٢,٣ x ١٠ ^٦ جرثومة/مللي مقارنة بـ x١٣٨,٨ ١٠ ^٦ جرثومة/مللي للعزلة KF-1 عند نفس الزمن علي الرغم من ان كمية اللقاح المستخدمة في الأخيرة ١ x ١٠ ^٦ جرثومة/مللي أكبر من تلك المستخدمة في العزلة DK-2 وهي ٠,٧ x ١٠ ^٦ جرثومة/مللي.

ثالثا: بالنسبة للعزلة KF-3 فقد أعطت أعلي عدد من الخلايا الخضرية وهو ٢٧٦ x ١٠ ^٦ خلية/مللي بعد ٣٦ ساعة وعند نفس الزمن أعطت أعلي عدد للجراثيم وهو ٩٧,٣ x ١٠ ^٦ جرثومة/مللي وهو يمثل زمن الحصاد لتلك العزلة وقد لوحظ أن هذه العزلة تميزت بإنتاجها القليل من الجراثيم.

٩- دراسة بعنوان "التداخل بين باسيللوس ثورينجنسيز والنيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة دودة ورق القطن المصرية سبودوبترالبتوراليس" للسيد/ خالد حسين أحمد حسين للحصول علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية من كلية الزراعة جامعة القاهرة عام ٢٠٠٠.

اثنان من أهم العناصر الممرضة للحشرات:

هي بكتريا Bacillus Thurintgiensis، النيماتودا المنتمية إلى الجنس Steinermema و Heterorhabditis هي محل الاهتمام في الدراسة الحالية.

تم بحث تأثير خليط من النيماتودا STEINERMEMA CARPOCAPSAE (WEISER) أو النيماتودا HETERORHABDITIS BACTERIOBHORA (POINER) مع مستحضرين تجاريين من البكتريا (DIPEL 2 X , DELFEN) BACILLUS THURINGIENSIS VAR KURSTAKI ضد العمر اليرقي الرابع، الخامس، السادس، العذارى لحشرة فراشة ورق القطن المصرية SPODOPTERA LITTORALIS.

ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها كالتالي:

١- التأثير علي العمر اليرقي الرابع: عند خلط Steinernema carpocapsae مع Dipel 2x كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة ٢٧,٨٩، ٢٧,٦١، ٤٩,٤٣، ٢١,١٢ طور يرقي معدي/يرقة بمعاملة النيماتودا بمفردها وعند خلطها مع Dipel 2x بتركيز ١، ٠,٥، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي وهذه القيم قلت بعد ٩٦ ساعة من المعاملة ١، ١٣,٣٧، ١٥,٧٠، ٢٧,١٣، ٨,٤٦ طور يرقي معدي/يرقة من دودة ورق القطن لنفس المعاملات علي التوالي.

- عند خلط S. carpocapsae مع Delfin كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ٢٧,٨٩، ٥,١، ٢٨,٠٢، ٣٠,٠٦، طور يرقي معدي/يرقة وذلك عند معاملة النيماتودا بمفردها وعند خلطها مع delfin بتركيزات ١، ٠,٥، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي وبالمثل كانت القيم بعد ٩٦ ساعة من المعاملة ١٣,٣٧، ٥,١، ٢١,٥١، ٩,٨٢ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي.
- عند خلط .H. bacteriophora مع بكتريا dipel 2X كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ٢٨,٥٥، ٦٣,٠١، ١٦,٩٦، ٢٢,١٦، وذلك بمعاملة

النيماتودا بمفردها. وعند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي. هذه القيم انخفضت بعد ٩٦ ساعة من المعاملة إلى ١٤,١٣، ١٢,٧، ٩,٩٦، ٩,١٣ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي.

- عند خلط النيماتودا .H. bacteriophora مع delfin كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ٥,١١، ٢٨,٥٥، ٢٨,٠٢، ٣٠,٠٦ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بمعاملة النيماتودا بمفردها وعند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥ جم/لتر علي التوالي. وبالمثل كانت القيم بعد ٩٦ ساعة من المعاملات كالاتي ١٤,١٣، ٣,٤٩، ١٤,٥٢، ٥,٦٢، طور برقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي.

معظم اليرقات التي مازالت علي قيد الحياة بعد ٩٦ ساعة من المعاملة فشلت أن تنسلخ الي العمر اليرقي الخامس. معدل تواجد ونمو النيماتودا في اليرقات الميتة يتراوح بين ٧٤,٨٦ الي ٩٦,٤٣٪ في حالة S. carpocapsae ومن ٥٨,٤٤ الي ٩٢,٤٦٪ في حالة .H. bacteriophora. كما وجدت خلايا وجراثيم من B.thuringensis في بعض اليرقات الميتة.

٢- التأثير علي العمر اليرقي الخامس:

- عند خلط S.carpocapcae مع بكتريا dipel 2X كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ١٤٤,٥٣، ٤٩,٧٩، ٢٥,٠٥، ٢٦,٨٣ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها عند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥جرام/لتر عي التوالي وبالمثل كانت القيم عندما خلطت مع Delfin ١٤٤,٥٣، ٢٣,٨٧، ٢٥,٠٥، ٢٦,٨٣ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي.
- عند خلط .H. bacteriophora مع dipel 2X كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ١٨١,٥٩، ١٠,٩٩، ١٠,٣٥، ٢٢,١٧ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها وعند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥جرام/لتر علي التوالي وكانت هذه القيم ١٨١,٥٩، ١٨,١٧، ٢٥,٠٥، ٢٦,٨٣، طور يرقي معدي/يرقة عند خلط مع Delfin لنفس المعاملات علي التوالي.

بعـــد ٩٦ ساعة من المعاملة، كل المعاملات أدت إلى موت كل اليرقات لـــدودة ورق القطن. معدل تواجد ونمو النيماتودا في اليرقات الميتة تتراوح بين ٤٦,٧٧ ـ ٩٠,٥٢٪ S.carpocapsae، ٥,٧٧ ـ ٣٦,٦٧٪ للـــــــــــ H. bacteriophora.

٣ـ التأثير علي العمر اليرقي السادس

- عـــند خلط S.carpocapcae مع dipel 2X كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة من المعاملة كالآتي: ١٦٢,٥٥، ١٤,٥٢، ٢٠,٦٥، ٢٢,٦٥ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملـــة بالنـــيماتودا بمفردها وعند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥جـــرام/لـــتر علـــي التوالـــي. وعندما خلطت مع Delfin بالمثل كانت القيم ١٦٢,٥٥، ٢١,٠١، ١٣,٤٧، ٣١,٥٨ طور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي. وبعد ٩٦ ساعة من المعاملة سجلت نسب موت مكتملة لكل المعاملات.
- عـــند خلط H. bacteriophora. مع dipel 2X كانت قيم LC_{90} بعد ٤٨ ساعة مـــن المعاملـــة كالآتي: ٤٨,٥٤، ١٢٩,٥٧، ٥٨,٥٧ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملـــة بالنـــيماتودا بمفردها وعند خلطها مع dipel 2x بالتركيزات ١، ٠,٥٠، ٠,٢٥جرام/لتر علي التوالي. بعد ٩٦ ساعة من المعاملة القيم انخفضت إلى ٤٨,٥٤، ٢٢,٣٢، ٢١,٠٥ طـــور يرقي معدي/يرقة لنفس المعاملات علي التوالي. قيم LC_{90} عـــند خلـــط H.bacteriophora. مـــع Delfin كانت ٧١,٢، ٣٨,٤٩، ٤١,٠٦، ٣٢,٢٧ طور يرقي معدي/يرقة وذلك بالمعاملة بالنيماتودا بمفردها وعند خلطها مع Dipel 2xالتركيزات ١،٠,٢٥،٠،٠٥٠ جرام/لتر علي التوالي. وسجلت نسب الموت مكـــتملة بعد ساعة من المعاملة. اليرقات التي ما زالت علي قيد الحياة من معاملات النيماتودا المنفردة تحولت إلى عذراء طبيعية أما اليرقات التي مازالت علي قيد الحياة وعوملت بالخليط وجد فيها بعض التشوهات بالعذاري.

ـ التأثير علي طور العذاري

عند خلط H.bacteriophora. ٤٠ طور يرقي معدي/عذراء مع Dipel 2x K , Delfin بتركيز ١ جم/لتر أدت إلى نسبة موت بالعذاري ١٣,٣٣٪ فقط. كل العذاري التي مازالت علي قيد الحياة أنتجت حشرات كاملة طبيعية.

١٠- دراســة بعنوان "تقويم بعض المستخلصات النباتية والبكتريا في مكافحة الدودة القارضــة (أجــروتس ابسيليون) حرشفية الأجنحة للسيدة/ سامية زين سيد جاد الله للحصــول علــي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم (علم الحشرات) من كلية العلوم جامعة عين شمس عام ٢٠٠١.

تــناول البحث دراسة تأثيرات بعض المستخلصات النباتية كمصادر طبيعية ضد حشــرة الــدودة القارضة التي تعتبر من الآفات الحشرية الخطيرة للعديد من الحاصلات الزراعية.

النباتات التي تم استخلاصها كانت:-

١- الفلفل الأسود Piper nigrum

٢- الترمس Lupinus termis

٣- الزنزلخت Melia azedarach

٤- الثوم Allium sativum

كما استهدفت الدراسة إلقاء الضوء عن إمكانية استخدام نوعين من البكتريا كمبيد حيوي في مكافحة الدودة القارضة وهما:

Cry I (A) of Bacillus thuringiensis

Cry I (C) of Bacillus thuringiensis

تأثير المستخلصات النباتية علي موت اليرقات:

أثبتــت الدراســة أن مستخلص الفلفل الأسود كان أكثر تأثيرا علي موت اليرقات حيــث بلغــت قيمة الجرعة النصف مميتة لكل من الفلفل الأسود والترمس. والزنزلخت والــثوم هــي ٣,٥٨، ٦,٦٩، ٧,٨٦، ١١,٦٨٪ علي التوالي علي العمر اليرقي الأول. بيــنما كانــت للعمر اليرقي الثاني ٤,٤٠، ٧,٣٨، ٨,٥٨، ١٢,٣١٪ علي التوالي بينما كانت الجرعات النصف مميتة للعمر اليرقي الرابع ٧,١١، ١١,٣٥، ١٢,٥٧، ١٨,٥٨٪ علي التوالي. أمكن ترتيب المستخلصات النباتية حسب شدة تأثيرها علي الأطوار اليرقية المســتخدمة (العمــر الأول والثانــي والــرابع) كالتالي: الفلفل الأسود > الترمس > الزنزلخت > الثوم (الأقل تأثيرا من المستخلصات الأخرى).

تأثير البكتريا علي موت اليرقات:

وجـد من معاملة اليرقات أن العمر الأول كان حساس لنوعي البكتريا المستخدمة بالمقارنـة بالعمريـن الثاني والرابع. أوضحت النتائج أن البكتريا Cry I (C) أكثر من الـ Cry I (A) حيث وجد أن قيمة الجرعة النصف مميتة (LC_{50}) للبكتريا Cry I (C)لكـل مـن الطـور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي هي ١,٥٢، ١,٦٥، ٢,٧١ جـم/لـتر، بينما بلغت قيمة الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A) علي نفس الأطـوار اليرقـية ٣,٦٣، ٤,٤٤، ٦,٥٣ جم/لتر علي التوالي. كما أظهرت النتائج أن أعلـي نسـبة موت لليرقات كانت عندما تم تغذية اليرقات علي أوارق الخروع المعاملة بالجـرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) بينما سجلت أقل نسبة موت كانت عندما تمت المعاملة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A).

* تأثـير خلط الجرعات النصف مميتة للمستخلصات النباتية المستخدمة والبكتريا علي موت اليرقات:

أظهـرت النتائج أن خلط التركيز النصف مميت للمستخلصات النباتية المستخدمة مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) أعطي نسبة موت في اليرقات أعلي من خلطها مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A).

كمـا أوضـحت النتائج أيضا أن خلط مستخلص الفلفل الأسود مع كل من نوعي البكـتريا Cry I (A) Cry I (C) أعطـي أعلي نسبة موت في الأطوار اليرقية الأول والثانـي والرابع. بينما أظهرت النتائج أن أقل نسبة موت كانت عند استخدام مستخلص الثوم مع البكتريا Cry I (A). عند تربية العمر اليرقي الأول علي أوارق خروع معاملة بالجـرعة النصـف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود مع البكتريا Cry I (C) كانت نسبة المـوت بعـد اليوم الثالث والخامس والسابع كالتالي (٥٠,٠، ٧٧,٣، ٩١,٣٪) وللطور اليرقـي الثاني كانت النسبة المئوية لموت اليرقات كالتالي (٤١,٠، ٦٤,٦، ٨٣,٣٪) أما بالنسـبة للعمر اليرقي الرابع كانت كالتالي (٣٤,٠، ٤٧,٠، ٧٠,٤٪). يتضح من النتائج أن أقل نسبة مئوية لموت اليرقات كانت عند استخدام الجرعة النصف مميتة لمستخلص الثوم وخلطة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (A) فقد كانت النسبة المئوية لموت اليرقات في العمر الأول والثاني والرابع بعد ٣،٥،٧ أيام كالتالي (٣١,٠، ٤٧,٩، ٥٨,٦ ٪)، (١٥،٣٢،٥٣٪).

أظهـر ترتيب تأثير المستخلصات النباتية علي النسبة المئوية لموت اليرقات بدءا مـن الأكـثر تأثـيرا فالأقل كانت كالتالي الفلفل الأسود > الترمس >الزنزلخت >

مستخلص الثوم ولكن عند خلط المستخلصات النباتية مع البكتريا وجد أن مستخلص الزنزلخت أقوي تأثيرا من الترمس.

تأثير الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C) والخلط بينهم علي الخصوبة والإنتاجية للدودة القارضة.

لوحظ أن عدد البيض لكل أنثي قد انخفض عند تغذية الطور اليرقي الأول والثاني والرابع بأوراق الخروع المعاملة بالجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا(C) Cry I. أوضحت النتائج أ، أقل تأثير لوحظ عند معاملة اليرقات بمستخلص الفلفل الأسود بينما كان تأثير البكتريا Cry I (C) أكثر فاعلية منه. ولوحظ أيضا نفس التأثير عند فقس البيض عند المعاملة بالجرعة النصف مميتة للبكتريا أقل من عدد البيض الذي تم فقسه عند المعاملة بمستخلص الفلفل الأسود. عند خلط الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا (Cry I (C فأن عدد البيض لكل أنثي والنسبة المئوية للفقس قد انخفضت بشكل معنوي.

لوحظ أن عدد البيض الناتج من تزاوج (أنثي معاملة X ذكر معامل) الناتج من تربية الأطوار اليرقية المختلفة علي أوراق الخروع المعاملة بالجرعة النصف مميتة لكل من مستخلص الفلفل الأسود والبكتريا (Cry I (C قد انخفض وأيضا انخفضت النسبة المئوية للفقس انخفاضا معنويا. وكان التأثير أقوي عند خلط الجرعة النصف مميتة لكل من المركبين.

لوحظ أن فترة وضع البيض انخفضت عند معاملة اليرقات بالجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفل الأسود من ١٢,٩ يوم لغير المعامل الي ٦,٤، ٨,٦، ٩,٢ يوم للمعامل للطور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي. كما لوحظ ايضا ان استخدام الجرعة النصف مميتة للبكتريا (Cry I (C اثر علي فترة وضع البيض فقد انخفضت الي ٥,٨، ٧،٩ يوم للطور اليرقي الأول والثاني والرابع علي التوالي.

أظهرت النتائج انه عند خلط مستخلص الفلفل الأسود مع البكتريا Cry I (C) قد انخفضت فترة وضع البيض انخفاضا معنويا الي ٣ يوم للعمر الأول ٣,٢ للعمر الثاني ٧,٤ يوم للطور اليرقي الرابع أما فترة ما قبل وما بعد فترة وضع البيض فقد لوحظ أنها زادت عند معاملة اليرقات بالمركبات المختلفة.

التأثيرات الهستوباثولوجية لمستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I(C) والخلط بينهم علي الدودة القارضة:

أظهـر الفحـص المجهـري للمعـي الوسطي للطور اليرقي الرابع أن استخدام الجـرعة النصـف مميتة لكل من مستخلص الفلفل الأسود والبكتريا Cry I (C) يؤدي إلـى ظهور عدة أعراض هستوباثولوجية أو مرضية مثل تهتك في العضلات والخلايا الطلائية ووجود فجوات كما لوحظ انفصال الغشاء حول الغذائي وكذلك الغشاء القاعدي. تبيـن مـن الفحص المجهري انه عند استخدام خليط الجرعة النصف مميتة لمستخلص الفلفـل الأسـود مع الجرعة النصف مميتة للبكتريا Cry I (C) كان أكثر فاعلية علي اليرقات عنها منفردة.

١١- "دراسات مقارنة على التأثيرات البيولوجية والسمية لبكتريا باسيلليس ثيورنجنسيز ومستخلصات نبات النيم على دودة اللوز القرنفلية "للسيد أحمد إبراهيم أمام إسماعيل للحصول على درجة الماجستير "حشرات" من كلية العلوم - جامعة عين شمس ٢٠٠١ تحت أشراف أ.د. عادل كمال السيد، أ.د. عبد الرحمن جمال الدين ، د. ليلى سيد على حموده.

تعتبر دودة اللوز القرنفلية من أهم وأخطر الآفات التى تهاجم محاصيل عديدة وخاصة زراعات القطن ومحاصيل العائلة الخبازية الأخرى. ولقد أستهدفت هذه الدراسة مقارنة تأثير الجرعات المطبقة من مستحضرات النيمازال التجارية (نيمازال T ٥% أزدرختن ونيمازال F ٥% أزدرختن ونيمازال T/S ١% أزدرختن) والمستحضر التجارى الميكروبى البكتيرى أجرين (المحتوى على ٣٢٠٠٠ وحده دوليه / ملليجرام والمستخلص من (thuringiensis var. Egyptii Bacillus) على النواحي الحيوية المختلفة لليرقات والعذارى والأطوار البالغة.

تم دراسة تأثير الجرعات تحت المميتة من مستحضرات النيمازال والأجرين على الخواص الحيوية لليرقات والعذارى والفراشات الناتجة وكذا تأثيراتهم المتأخرة (الكامنة) على خصوبة الإناث من ناحية وضع البيض ونسبة الفقس. وقد تم تأكيد هذه النتائج بدراسة التشوهات التشريحية على المعى المتوسط للعمر اليرقى الرابع وعلى أعضاء التناسل (الخصى والمبايض) للذكور والإناث.

ويمكن تلخيص النتائج كما يلى:

أولاً: مستحضرات النيمازال

١-١ **التأثير على الطور اليرقي:** أدت المعاملة بمستحضرات النيمازال الى موت اليرقات وقد ارتفعت نسبة موت اليرقات بمرور الوقت وبزيادة التركيزات المطبقة الى أن ظهرت أعلى نسب موت فى اليرقات التي تم معاملتها بأعلى الجرعات. وبمقارنة الثلاثة مستحضرات المختبرة كان مستحضر النيمازال T/S هو الأكثر تأثيرا حيث أحدث تركيز ٢٥ جزء فى المليون منه نسبة ١٠٠ % موت لليرقات. وقد لوحظ تأخر موت اليرقات حيث بدأت بنسبة موت بسيطة (أمكن إهمالها) وذلك خلال أول يومين من المعاملة ثم ازدادت تصاعديا بعد ذلك. كما أثرت مستحضرات النيمازال على معدل نمو وتحول اليرقات منتجة بعض

الأشكال اليرقية المشوهة فعند الجرعات العالية أستمر عمر اليرقات المعاملة لمدة أسبوعين بعد انسلاخ الطور البالغ فى اليرقات الغير معاملة إلى أن ماتت دون أن تنسلخ وقد سميت هذه اليرقات باليرقات الدائمة.

١ــ٢ **التأثير على الطور العذري:** تميزت مستحضرات النيمازال بتأثيرها على نسبة موت العذارى، فبالمقارنة بالجرعات المطبقة من النيمازال T و F وجد أن تركيزا صغيرا من النيمازال T/S كان كافيا لتقليل تكون العذارى السيمة. وقد وجد أيضا أن مستحضرات النيمازال قد أثرت على معدل نمو العذارى منتجة أشكالا عذرية مشوهة مثل تكون الأطوار الوسطية بين العذارى واليرقات. وعلى النقيض من اليرقات الدائمة فقد ظهرت هذه الأطوار الوسيطة بنسبة كبيرة نسبيا فى التركيزات المنخفضة.

١ــ٣ **التأثير على الطور البالغ:** أحدثت التركيزات المطبقة من مستحضرات النيمازال على البيئة الصناعية للعمر اليرقي الأول تأثيرا مثبطا لنسبة خروج الفراشات. وقد كان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأكبر على خروج الفراشات حيث وصلت نسبة الخروج الى ٦% عند تركيز ١٥ جزء فى المليون وعند تركيز ٢ ، جزء فى المليون وصلت نسبة الفراشات الناتجة الى ٤% الا أنها ماتت بمجرد خروجها من العذارى وقد رمز لها بالرمز A. وقد تم تسجيل بعض حالات التشوه أثناء خروج الفراشات من العذارى مثل الفراشات مطوية أو قصيرة الأجنحة ورمز لها بالرمز PA. أمكن بعد ذلك تعيين نسبة الأفراد التى لم تستطيع أن تتحول إلى فراشة بالغة سليمة وقد زادت نسبة هذه الأفراد بزيادة الجرعات المطبقة الى أن وصلت الى أعلى نسبة عند أعلى جرعة مطبقة من النيمازال T/S. إسنادا إلى قيم الجرعات النصف قاتلة (LC ٥٠) أمكن ترتيب مستحضرات النيمازال ترتيبا تصاعديا تبعا لفاعلية تأثيرها على أطوار الحشرة المختلفة بداية بالنيمازال F (LC ٥٠ = ٢، ٢٣٢ جزء فى المليون) ومرورا بالنيمازال T (LC ٥٠ = ٩، ٤٥ جزء فى المليون) ثم النيمازال T/S (٥٠ LC = ٦٧، ٢ جزء فى المليون).

٢ــ تأثير مستحضرات النيمازال على عمر اليرقات والعذارى والفراشات

أثبتت مستحضرات النيمازال فاعليتها على أطوال أعمار اليرقات والفراشات البالغة تحت مختلف مستويات التركيزات المطبقة فى حين لم تختلف أطوال أعمار العذارى الناتجة من المعاملة عن مثيلاتها الغير معاملة. عموما فانه لوحظ زيادة أطوال أعمار

اليرقات بزيادة التركيزات المطبقة من الثلاثة مستحضرات. وعلى النقيض لم تختلف أطـوال أعمـار العـذارى الناتجة من اليرقات المعاملة عن مثيلاتها فى المجموعة الضابطة.

وبملاحظـة التأثـير على أطوال أعمار الفراشات الإناث (طول عمر الفراشة الأنثى = فـترة ما قبل وضع البيض + فترة وضع البيض + فترة ما بعد وضع البيض) وجد أن مستحضـرات النيمازال الثلاثة قد أطالت فترة ما قبل وضع البيض. وقد سجلت الجـرعات المطـبقة مـن النيمازال T/S أعلى زيادة فى فترة ما قبل وضع البيض مقارنـة بالـزيادة المعتدلة والضعيفة فى حالة النيمازال T و F على الترتيب. ومن ناحـية فترة وضع البيض وجد أنها كانت أقصر فى الإناث الناتجة من المعاملة عنها فى المجموعة الضابطة وقد تم تسجيل أقصر فترة وضع بيض فى الإناث الناتجة من المعاملـة بـأعلى جرعة من النيمازال T/S . أيضا تم تسجيل الخفض المعنوى فى فـترة ما بعد وضع البيض فى حالة التركيزات المطبقة من المستحضرين T/S، T فقط وإن كان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأعلى على فترة ما بعد وضع البيض. فى حين لم تظهر المعاملة بالنيمازال F تأثيرا معنويا على فترة ما بعد وضع البيض الا عند أعلى جرعه مطبقه.

وحيـث أن هـذه الفـترات الثلاثة تشكل المحصلة النهائية لطول عمر الإناث لذلك فإن التغيـير فيها نتيجة المعاملة يعتبر مسئول عن التغيير فى طول عمر الأنثى. بزيادة التركـيزات المطـبقة سجلت مستحضرات النيمازال الثلاثة قصرا معنويا فى أطوال أعمار الإناث إلى أن وصلت إلى أقصى قصر عند أعلى جرعة من النيمازال T/S. نفـس الاتجـاه قـد تحقق عند حساب دورة حياة الإناث ولكن على العكس فلم تصل المعاملـة بالنـيمازال F إلى حد التغير المعنوي. قد تم أيضا تسجيل القصر المعنوي فى أطوال أعمار ذكور الفراشات الناتجة من المعاملة بجرعات المستحضرات الثلاثة وكـان لجرعات النيمازال T/S التأثير الأكبر. وبحساب دورة حياة هذه الذكور وجد أن جـرعات المستحضـرين T و T/S قـد حققت قصرا معنويا فى حين لم يحقق مسـتوى القصـر فـى دورة حياة الذكور الناتجة من المعاملة بجرعات النيمازال F التغير المعنوي إلا فى الجرعات العالية.

٣ــ تأثـير مستحضـرات النـيمازال علـى الوزن: عند معاملة البيئة الصناعية لليرقة بجـرعات النـيمازال T ، F نتج يرقات وعذارى أقل فى الوزن من مثيلاتها الغير معاملـة وقـد أثبت الانخفاض فى معدلات النمو النسبي لليرقات هذه النتائج. وكانت

أقل اليرقات والعذارى وزنا وكذلك كانت أقل معدلات نمو لليرقات قد سجلت فى اليرقات والعذارى الناتجة من المعاملة بجرعات النيمازال T/S.

٤ـ **التأثير الطارد للنيمازال T/S**: تم تصميم هذه التجربة لإثبات التأثير الطارد للنيمازال T/S على اليرقات فى تجربة اختيار حر. فبعد ٣ أيام من المعاملة أزداد توجه اليرقات إلى الجزء الغير معامل بنسبة أكبر من الجزء المعامل وبتسجيل نسب موت اليرقات وجد أن اليرقات قد ماتت فى الجزئيين عند حواف أطباق بتري معنى ذلك أن موت اليرقات كان أما بسبب التأثير المباشر على اليرقات أو عن طريق التأثير الغير مباشر عن طريق رائحة النيمازال T/S.

٥ـ **تأثير رائحة النيمازال T/S**: وقد أحدث التعريض لرائحة النيمازال T/S نسب موت لليرقات قدرت ب ٢٤% مقارنة ب ٦% فى اليرقات الغير معاملة كما فانخفضت نسبة الأفراد التي لم تستطيع أن تتحول إلى فراشات بالغة سليمة بمعدل ٢٠%. وقد أثرت رائحة النيمازال أيضا تأثيرا معنويا على فترة ما قبل وضع البيض وفترة وضع البيض كما أحدثت انخفاضا معنويا فى قدرة الإناث الناتجة على وضع البيض بينما لم تحدث الرائحة تأثيرا معنويا فى نسبة فقس البيض.

٦ـ **تأثير مستخلصات النيمازال على وضع وفقس البيض**: أثرت الجرعات المختلفة من مستخلصات النيمازال الثلاثة على قدرة الإناث الناتجة من المعاملة فى كلا من وضع وفقس البيض. وقد سجلت أعلى جرعة من النيمازال T/S نسبة عجز جنسي كاملة مقارنة بالتأثير المعتدل والضعيف فى حالة الإناث الناتجة من المعاملة بمستحضري T و F على الترتيب وبحساب نسبة العجز الجنسي ونسبة الانخفاض فى عدد البيض الموضوع وعدد البيض الفاقس أمكن إثبات التأثير الممتد لمستحضرات النيمازال.

الدراسات التشريحية

١ـ الفحوصات التشريحية للمعدة الأوسط

يمكن تلخيص التشوهات النسيجية في المعي المتوسط لليرقات الناتجة من المعاملة كما يلي: تحطم الغشاء لحول غذائي. تحلل الخلايا الطلائية وظهور فجوات بها وانفصالها عن الغشاء القاعدي.

٢ـ الفحوصات التشريحية لأعضاء التناسل

٢-١- **التأثــير علــى الخصــية**: أوضحت القطاعات الطولية فى الخصية الناتجة من المعاملـة بعض التشوهات ويمكن تلخيصها فيما يلى: تحلل الحواجز بين قنوات الخصية. تحطم وتحلل الخلايا الجرثومية أثناء المراحل المختلفة لتكون الحيوانات المنوية. تحطم حزم الحيوانات المنوية وانكماش محتويات الخصية.

٢-٢- **التأثــير علــى المبــيض**: أوضــحت القطاعات الطولية فى المبيض الناتج من المعاملـة بعـض التشوهات ويمكن تلخيصها فيما يلي: تحطم وتحلل البويضات وخلاياها المغذية وظهور فجوات بهما واختفاء الحواجز بينهما. انكماش المخ فى البويضات البالغة وتشوه جدارها.

ثانيا: مستحضر الأجرين

١-١ **التأثير على الطور اليرقى**: أظهرت النتائج علاقة طردية بين التركيزات البكتيرية ونسبة موت اليرقات فقد سجلت أعلى نسبة موت عند أعلى تركيز بكتيرى مطبق بعد أول ٣ أيام من المعاملة وبمرور الوقت انخفضت نسبة الموت إلى أن أنعدمت فى اليوم الثامن من المعاملة.

١ـ٢ **التأثير على الطور العذري**: أظهرت المعاملة بجرعات الأجرين المختلفة انخفاض تدريجــي معــتدل فى نسبة التعذر مقارنة بنسبة تعذر اليرقات الغير معاملة. وقد أظهرت المعاملة تأثير ضعيف على موت العذري فلم تتجاوز نسبة موت العذري ٤% عــند تركــيز ١٠ جرام/لتر. وعند الجرعات المتوسطة تم تسجيل نسبة من الــيرقات التــي قــد زاد طــول عمــرها اليومي إلى حوالي ٣٠ يوم وبعد ذلك استطاعت أن تكمل نموها الطبيعي منتجا عذارى صغيره.

١-٣ **التأثــير على الطور البالغ**: أظهرت النتائج علاقة طردية بين التركيزات البكتيرية المطبقة ونسب خروج الفراشات وقد كانت أعلى نسبة عجز فى خروج الفراشات قــد ســجلت عــند أعلى تركيز مطبق. وفى النهاية أمكن حساب نسب الفشل فى تكويــن الأطوار البالغة والتي تغيرت طرديا مع التركيزات المستعملة. بملاحظة التأثــير البكتيري على مختلف أطوار دودة اللوز القرنفلية يمكن القول بأن التأثير السام يقتصر على الطور اليرقي أما التأثير على باقي الأطوار فإنه مرضى أكثر منه تأثير سام. استنادا إلى قيم الجرعات النصف قاتلة (LC ٥٠) وجد أن تركيز ٥٨، ٥٣ جم/لتر كان كافية لقتل نصف التعداد المختبر.

٢ـ تأثير مستخلص الأجرين على العمر اليرقي والعذرى والفراشات: استهدفت هذه التجربة دراسة التأثير الممتد لمعاملات البكتريا على أطوال الأعمار لليرقة والعذراى والأطوار البالغة. أحدثت معاملات العمر الأول بتركيزات الأجرين المختلفة ازديادا طرديا فى طول العمر اليرقي. وقد تم تسجيل التغير المعنوي فى طول العمر اليرقي بداية من التركيز ٥، ٢ جم/لتر بحوالي ٦، ١٥ يوم إلى أن وصلت إلى ٨، ١٦ يوم عند تركيز ٢٠ جم/لتر مقارنة ب ٧، ١٤ يوم فى مثيلاتها الغير معاملة. على النقيض فلم تحدث معاملات الإجرين أى تغيرات معنوية فى أطوال أعمار العذارى الناتجة من اليرقات المعاملة.

وبالنسبة للتأثير على أطوال أعمار إناث الفراشات الناتجة فلم تتأثر جميع فتراتها (فترة ما قبل وضع البيض وفترة وضع البيض وفترة ما بعد وضع البيض) تأثيرا معنويا نتيجة للمعاملة. ففي حين تغيرت فترة ما قبل وضع البيض بالزيادة وفترة وضع البيض بالنقصان وكان التغير معنوي ضعيف فإنه لم تختلف فترة ما بعد وضع البيض عن مثيلاتها فى الحشرة الغير معاملة. وعلى ذلك فأن المحصلة النهائية لطول عمر الإناث قد نقصت تدريجيا إلى أن وصلت إلى النقصان المعنوي عند الجرعات العالية فقط. بالنسبة للتأثير على ذكور الفراشات الناتجة فقد تم تسجيل تغير معنوي طفيف فى أطوال أعمارها عند الجرعات العالية فقط فى حين لم يصل التغير فى دورة حياتها إلى حد المعنوية.

٣ـ تأثير مستخلص الأجرين على الوزن: كان لتركيزات الأجرين المختبرة تأثير معتدل على أوزان اليرقات والعذارى وأيضا على معدل نمو اليرقات فقد بدأ النقصان المعنوي فى أوزان الطور اليرقي والعذري عند التركيزات الوسطى إلى أن وصل إلى أعلى قيمة له عند أعلى تركيز. وبالنظر إلى معدل نمو اليرقات المعاملة وجد أن نسبة من العينات اليرقية قد قل وزنها بشكل واضح وبالذات عند الجرعات العالية وهذه اليرقات بعضها مات فى العمر اليرقى والبعض الأخر استطاع أن يكمل نموه ويمكن إرجاع هذا التأثير إلى حساسية اليرقات للبكتيريا وسمومها.

٤ـ تأثير مستخلص الأجرين على وضع وفقس البيض: أظهرت معاملات العمر اليرقي الأول بالأجرين تأثيرا ممتد على الإناث الناتجة من حيث عدد البيض الموضوع ونسبة فقسه. حيث أوضحت الدراسة وجود علاقة عكسية بين الجرعات الميكروبية المطبقة وعدد البيض الموضوع والفاقس. وقد أمكن إثبات هذه النتائج بتوضيح العلاقة الطردية بين الجرعات المطبقة والنسب المئوية للعجز الجنسي وكذا

العلاقة العكسية بين الجرعات المطبقة وكلا من نسبة العجز فى وضع البيض ونسبة فقس البيض.

الدراسات التشريحية

١- الفحوصـــات التشـــريحية المعي المتوسط: يمكن تلخيص التشوهات النسيجية فى المعـــي المتوســـط للـــيرقات الناتجة من المعاملة كما يلى: تحطم الغشاء الحول غذائى، تحلل الخلايا الطلائية وظهور فجوات بها.

٢-الفحوصـــات التشـــريحية لأعضاء التناسل: أظهرت المعاملة بمستحضر الأجرين تأثيرا ضعيفا على كلا من الخصية والمبيض.

١٢- "دراســات توكسيكولوجية على بدائل المبيدات الكيماوية" للسيدة/ جيهان فتحى علــى محمــود للحصــول علــى درجة ماجستير فى كيمياء المبيدات من كلية الــزراعة - جامعة الأسكندرية (٢٠٠١) تحت أشراف أ.د. نبيل أحمد منصور ، أ.د. محمــود مرشــدى فــرج ، د. شبل محمد شرابى أساتذة كيمياء المبيدات بالكلية.

تهـدف الدراســة إلــى استخدام المنهج البحثي العلمي فى تقييم المكافحة الحيوية للحشــرات باستخدام بكتريا الباسيلس ثيرونجينسيس كأحد وأهم الوسائل المقترحة الآمنة بيئــيا لمكافحــة الآفات الحشرية. وقد تم خلال ذلك تقييم عدة تجهيزات من هذه البكتريا ضـــد بعض الآفات الحشرية التي تهاجم محصولي الذرة الشامية والقطن فى مصر لما لهذيــن المحصــولين مــن أهمــية اقتصادية وكذلك خلط هذه التجهيزات البكتيرية مع تركيزات منخفضة من بعض المبيدات الكيماوية لتحقيق أعلى مستوى من المكافحة دون الأضرار بالأعداء الطبيعية.

خــلال هــذه الدراسة قمنا بإجراء التجارب المعملية على ثلاث آفات حشرية من رتبة حرشفية الأجنحة هى دودة القصب الكبيرة وحفار ساق الذرة الأوربى ودودة ورق القطــن والأخــيرة تــم مقارنة السلالات المرباة معمليا بتلك المتحصل عليها حقليا وقد شملت الدراسة النقاط التالية:

أولا: القــدرة الإبادة لتجهيزات مختلفة محتوية على النوع kurstaki ضد يرقات دودة القصـــب الكبيرة وكذلك يرقات حفار ساق الذرة الأوربي وذلك باختيار عدد ثلاث تجهيزات من بكتريا B.t وهى:

دايبيل ٢ أكس، تيوركس ، ديلفين Dipel 2X, Turex and Delfin ضد يرقات العمــر الثالث لكليهما باستخدام طريقة غمر عقل من ساق الذرة فى عمر ٣٠ يوم عــند تركيزات مختلفة. وقد سجلت قيم التركيزات النصف مميته LC_{50} بعد مرور ٤ أيام اختلافا محسوسا حيث كانت تجهيزه التيوركس أقدر التجهيزات على أحداث السمية يليها دايبيل ٢ إكس بينما الديفلين كانت أقل سمية. وقد دلت النتائج على أن يــرقات دودة القصب الكبيرة أكثر حساسية للتجهيزات البكتيرية المستخدمة مقارنة بيرقات حفار ساق الذرة الأوربى.

ثانــيا: خلــط الدايبــيل ٢-إكس مع بعض المبيدات الكيماوية المستخدمة لمكافحة دودة القصـــب الكبــيرة: المبيدات المستخدمة كانت ديازينون ، ميثوميل ، فينفاليرات -

وعـند معاملـة اليرقات في العمر الثالث بقيم التركيزات النصف مميتة ثم معاملة الـيرقات بتركيزات مختلفة من المبيدات المختارة لوحظ أن قيم التركيزات النصف مميـتة بعـد المعاملة بمخلوط السلالة البكتيرية والمبيد انخفضت بدرجة ملحوظة يتضـح ذلك عند حساب معامل التنشيط (P.F) حيث بلغت قيم معامل التنشيط ٥، ١٧ ، ٠٤، ١٣ ، ٠٨، ٨ لكـل مـن الديازيـنون ، الفينفاليرات ثم الميثوميل على الترتيب.

ثالـثا: القـدرة الإبـادة للتجهـيزات المختلفة وكذلك مخلوط الجراثيم/البللورات الفعال المعـزول مـن السـلالات الأصلية hurstaki HDI, kurstaki HD 73 and entomocidus ضـد يرقات العمر الثانى لدودة ورق القطن (مقارنة بين السلالة المعملـية والسـلالة الحقلية). بقياس معامل التحمل (TV) بين السلالات المختبرة (المعملـية والحقلـية) فقـد أوضحت النتائج أن السلالة الحقلية ربما تقع فى نطاق الـتحمل وأحيانا فى نطاق المقاومة الحقيقية فى الاستجابة للمجموعات المختلفة من المبيدات الكيماوية وكذا المبيدات الحيوية المختبرة.

رابعـا: خلط دايبيل – ٢إكس والسلالة الأصلية HD-1 مع الكلوربيريفوس ، الميثوميل والفينفاليرات ضد يرقات العمر الثانى من دودة ورق القطن.

أوضـحت النـتائج أن قـيم التركيزات النصف مميتة للمبيدات انخفضت بدرجة ملحوظة وذلك بعد معاملة الحشرات بالسلالات البكتيرية (قيم النصف مميتة) ثم استخدام تركـيزات مخـتلفة مـن المبيدات. كما أوضحت نتائج الخلط مع المبيدات وجود فعل تنشيطي لجميع المبيدات خاصة عند استخدام التركيزات المرتفعة منها.

خامسـا :الـتداخل البيوكيمـيائى للسـموم البكتيرية مع بعض الأهداف البيولوجية فى الحشـرات المسـتهدفة. تم اختبار تأثير قيم التركيزات النصف مميتة لكل من الدايبيل – ٢إكس و HD-1 على يرقات العمر الثانى ليرقات دودة ورق القطن وقد أتضح ما يلي:

١ــ تأثـير سـموم البكتـيريا .B.t علـى نشاط الإنزيم المحلل لمادة أدينوزين ثلاثى الفوسـفات :- أظهـرت السلالات البكتيرية المختبرة طبقا لقيم التركيزات النصف مميـتة تثبـيطا معنويا ملحوظا للنشاط النوعي للإنزيم خلال مراحل تطور اليرقة المختلفة.

٢ـ تأثير سموم البكتيريا على نشاط إنزيم H* , K* ATPase :- أظهرت السلالات البكتيرية المختبرة تثبيطا معنويا ملحوظا للنشاط النوعي للإنزيم خلال مراحل تطور العمر اليرقي (العمر الثانى ، الثالث ، الرابع) لدودة ورق القطن.

٣ـ تأثير سموم البكتريا على النشاط النوعي لإنزيم Alkaline phosphatase:

أوضحت النتائج أن استخدام الجرعات النصف مميتة لسلالات البكتيريا المختبرة أدت إلى تثبيط ملحوظ لنشاط الأنزيم المحلل لمادة البارا – نيتروفينيل فوسفات في الوسط القاعدي والذي قد يعد أحد أهم الإنزيمات المعلمة للغشاء الداخلي المبطن للقناه الهضمية الوسطى ليرقات حرشفية الأجنحة والذي من المحتمل أن يلعب دورا هاما في ميكانيكية فعل هذه السموم البكتيرية، كما أنه من المحتمل أن يعمل كأحد المستقبلات الهامة التي تحدد فعل وشكل السمومن البكتيرية المختبرة.

مما سبق يتضح أن موت اليرقات نتيجة المعاملة ببكتيريا B.T. تعد عملية متدرجة تتضمن سلسلة متتابعة من الأغراض تعتمد على مقدار التركيز المضاف وأنها ترتبط ارتباطا مباشرا بالتأثير على الغشاء الداخلي المبطن للقناة الهضمية مما ينتج عنه التلف العام للقناة الهضمية الوسطى.

الباب السادس

التحديات التى تجابة الانتاج والاستخدامات الخاصة بالبلسيلليس ثورينجينسيز فى الدول النامية

فــى السنوات الحديثة اجريت محاولات كثيرة ومضنية لايجاد وسائل بديلة لمكافحة الافــات والناقلات الحشرية للامراض التى تصيب الانسان. لقد كانت هذة المجهودات نتاج ظهــور العديــد من المشاكل فى جراء التوسع المفرط فى استخدام المبيدات التقليدية مثل: تطــور مقاومــة مجامــيع الحشرات للمبيدات الحشرية، السمية على الثدييات، الاعتبارات البيئــية. لقــد تــزايدت وبسرعة البحوث والتطوير فى مجال الوسائل الميكروبية لمكافحة الحشــرات خاصــة الــبعوض الــناقل لمسببات الملاريا وغيرها منذ اكتشاف الباسيلليس ثورينجينســيز تحــت النوع اسرائيلينسيز (B.T.I) عام ١٩٧٦. لبعض الوقت استخدمت العديــد مــن الســلالات من B.T. ضد الافات الحشرية. فى عام ١٩٨٣ تم توثيق اربعة شــركات فــى امــريكا الشمالية وواحدة فى فرنسا تنتج كميات تجارية من بكتريا B.T.I (Service ١٩٨٣). لقــد تمــت الاشارة الى ان السلالات المختلفة من تحت النوع B.T. ذات مجــالات مخــتلفة فى النشاط الابادى ضد الحشرات (دلماج واخرون ١٩٩٠). كذلك تحقق هذة السلالات المختلفة فاعلية مختلفة ضد انواع من الحشرات التى تقتلها مثل: تحت الــنوع كورســتاكى (HD-1) فعالــة ضد العديد من افات حرشفية الاجنحة ولكنها كانت ضــعيفة الفاعلية ضد البعوض وعديمة الفاعلية ضد الذباب الاسود. من جهة اخرى وجد ان تحــت الــنوع اسرائيبينســيز شــديد الفاعلية ضد البعوض والذباب الاسود ولكنة قليل الفاعلــية ضــد حشرات حرشفية الاجنحة (Barjac ١٩٧٨ أ،ب،ج). النشاط الابادى ضد الــيرقات لهــذة الكائــنات يرتــبط بالاجسام البللورية التى يطلق عليها دلتا-اندوتوكسين- الاجســام الــبللورية تظهر فى الخلايا فى وقت تجرثم الباسيلليس. كل التوكسينات وجدت ذات اوزان جزيئــية عالية فى البروتينات وهى تبدو على نفس المظهر بالرغم من اختلاف وزنهــا الجزيــئى ونوع الحشرات التى تقتلها. لقد وجد ان العزلة الفردية قد تنتج اكثر من توكســين واحد كما ان مجال هذة التوكسينات قد تختلف بشكل عريض (Dulmage and Cooperators ١٩٨١). فــى بعــض الحــالات تختلف كذلك الصفات الطبيعية لبلورات البروتيــن. كمــا فــى البللورات الصغيرة او الهرمية الثنائية (P_2 toxins) للباسيلليس Bt كورســتاكى HD-1 او B.T.K. التى وصفت بواسطة Yamamoto and Mclauyhlin (١٩٨١).

أولا: طرق جديدة بسيطة لانتاج وتجهيز الباسيلليس ثورينجنسيز فى تايلاند

حيث ان تايلاند تقع فى منطقة الرياح الاسيوية monsoon وهناك العديد من انواع البعوض التى تتوالد فى تايلاند والكثير منها كناقلات هامة لبعض الامراض مثل حمى نزيف البرنخ وحمى الدماغ الفيروسية والفلاريا والملاريا. لقد تمت الاشارة الى ان العديد من انواع البعوض يطور مقاومة للمبيدات الحشرية (Brown ١٩٨٦). فى الوقت الحالى العديد من الاهتمامات والنواحى البيئية ومشاكلها خلقت وحدثت بسبب الاثر الباقى الطويل للمبيدات والتاثيرات السامة على الكائنات غير المستهدفة بالاضافة الى تطور المقاومة لعدد من المبيدات الحشرية الكيماوية مما ادى الى بروز اتجاه البحث عن وسائل بديلة لمكافحة البعوض الناقل لمسببات الامراض. لقد اوصت هيئة الصحة العالمية WHO باستخدام البكتريا B.T.I. و B. spharricus كوسيلة بديلة لمكافحة الناقلات الحشرية. توجد عديد من المصانع فى امريكا واوربا تنتج هذة الوسائل الميكروبية على نطاق تجارى لمكافحة البعوض. تكاليف استيراد هذة المبيدات الحشرية الميكروبية مازالت عالية جدا فى الدول النامية مثل تايلاند بسبب بعد مسافة النقل من الدول المنتجة لذلك فان البحوث والتطوير عن الامكانيات المحلية لانتاج هذة الوسائل الميكروبية يكون اكثر مناسبة وملائمة لهذة الدول. لقد اتضح ان هذين النوعين من البكتريا يسهل تمثيلها فى بيئات بسيطة بشرط توفر عمليات انتاج مناسبة تاخذ فى اعتبارها العديد من العوامل المحددة.

مميزات الانتاج المحلى:

- هناك عدد من المميزات من جراء تشجيع وتحفيز تطوير امكانيات الانتاج المحلى للمبيدات الحشرية فى الدول النامية. فى البداية فان من اكثر المميزات اهتماما للانتاج المحلى ما يتعلق بثبات المنتج النهائى. من اكثر الصعوبات التى تقف عقبة فى استخدام المبيدات الميكروبية عدم الثبات وتباين سمية مستحضراتها. عدم الثبات هذا ينتج من طول فترة الشحن مصحوبة بطول وتباين درجات حرارة تخزين قبل وصول المنتج الى المستهلك. لقد خلص البحاث ورجال المكافحة ان هذة العوامل ادت الى عدم شيوع Bt فى مستحضرات مناسبة لمكافحة الحشرات وجعلها خيار مطروح لمكافحة الافات الحشرية من رتبة حرشفية الاجنحة. لذلك فان عيوب مماثلة قد تحدث فى برنامج مكافحة البعوض اذا كانت المبيدات الميكروبية المستخدمة فى برنامج مكافحة البعوض تنتج فيما وراء البحار ومن ثم تستورد كى تستخدم فى الدول النامية. لتجنب هذة المشاكل يجب تشجيع الانتاج المحلى.

- الميزة الثانية للانتاج المحلى تتعلق بالمستحضرات المناسبة. النجاح فى استخدام المبيدات الحشرية الميكروبية فى مكافحة يرقات البعوض تعتمد اساسا على المستحضرات المناسبة حيث ان انواع البعوض لها اماكن تواجد ومعيشة مختلفة حيث توجد الانوفيلس مينميس فى تيارات الماء بطيئة الجريان بينما توجد الانوفيلس ديريس فى الحفر القديمة. استخدام المبيدات الميكروبية فى اماكن مختلفة من المعيشة تتطلب طريقة مناسبة ومستحضر مناسب لبكتريا B.T.I و B. sphaericus. نظرة فاحصة للعديد من مستحضرات هذين النوعين من الباسيلليس فى الوقت الراهن تشير الى انهما طورا بواسطة شركات فى الدول الصناعية مع معلومات محدودة جدا والقليل من الاختبارات المناسبة تحت الظروف الحقلية الفعلية فى الدول الاستوائية حيث الحاجة لهذة الانواع من المركبات مطلوبة. الانتاج المحلى سوف يحقق بالتاكيد فوائد بداية من توفير مواد لاجراء الدراسات الحقلية المناسبة وكذلك تطوير مستحضرات مناسبة للظروف البيئة المحلية. بسبب الظروف البيئية المختلفة بشكل كبير بين انواع البعوض والدول الاستوائية حيث الحاجة لهذة الانواع من المركبات مطلوبة. الانتاج المحلى سوف يحقق بالتاكيد فوائد بداية من توفير مواد لاجراء الدراسات الحقلية المناسبة وكذلك تطوير مستحضرات مناسبة للظروف البيئية المحلية. بسبب الظروف البيئة المحلية. بسبب الظروف البيئية المختلفة بشكل كبير بين انواع البعوض والدول الاستوائية والظروف المعتدلة فى الدول الصناعية لذلك فانة يتوقع الا يكون هناك مستحضر واحد يمكن ان يحقق الفاعلية مع او تحت كل الظروف الحقلية.

ظروف النمو والزرع:

- بوجة عام فان بكتريا الجنس باسيلليس لا تتطلب بيئة نمو معقدة التركيب كما انها سهلة الاستزراع. لقد امكن الحصول على بيئة متخصصة (بوستن ، فرتيز وجيلى ١٩٨٥ ، روبرش وواتسب ١٩٨٥) وكذلك البيئة الروتينية اللازمة لتحقيق النمو المناسب والتجرثم وتجهيز التوكسين فى المعامل تحت الظروف التقليدية (كالفون واخرون ١٩٨٣). لقد اتضح ان التزويد بالهواء العادى كافى لزرع الباسيلليس ولا توجد ميزة فى زيادة التهوية او حتى الاستمرار فى تحمل تكاليف التهوية بعد استكمال تطور الجراثيم (بوستن ، واليس وسينجر ١٩٨٤ ، بوستن ، ماهيكار ، واليس ١٩٨٤). هناك ادلة تشير الى امكانية عمل تحويرات كبيرة فى عملية التخمر ولكن بشكل هادئ دون اى تغيير فى التوكسين الناتج. عندما تعامل خلايا Bt من تحت انواع اليستى ،

ايــزاواى ، كورســتاكى بالمطفرات للحصول على طفرات من جنس لا ينتج الجراثيم ولكــنه يظل منتجا للدلتا-اندوكسين (واكيساكا واخرون ١٩٨٢) التوكسين الناتج يكون ممــاثل تمامــا للعزلات الام. ان مسألة تخمر Bt من الامور المشجعة والضرورة اذا كان تخمر البكتريا Bt في الطريق لتصبح مقبولة ومتاحة عمليا.

- العلاقــة بيــن وجــود الاجسام الضمنية وسمية B.sphaericus تجاه يرقات البعوض مازالــت مخــتلفة عن انواع B.t. لقد اتضح ان سمية سلالة B. sphaericus 2297 زادت ارتباطا مع تكوين البللورات الضمنية (كالفون واخرون ١٩٨٤). لكن بعض من هــذة السلالات قد تسبب سمية ضد يرقات البعوض فى غياب الاجسام الضمنية. يمكن الحصــول علــى نمو جيد لبكتريا باسيلليس سفيريكس باستخدام طرق الانتاج المستمر وقــد اتضــح انهــا تنتج على الاقل ١٥-٢٥% من مستويات البريسبور Prespore levels المنــتج الــنهائى لهذا التحضير اظهر كفاءة ممتازة فى الرش الحقلى الواقعى (هرتلين واخرون ١٩٨١).

كفاءة تحسين انتاجية .B.t و B. sphaericus

اختيار المواد المغذية:

كما ذكر سابقا فان الاحتياجات العامة للباسيلليس من المواد المغذية تختلف من نوع لاخــر. فــى الــدول النامية مثل تايلاند اذا كانت عمليات التخمر اقتصادية يجب ان تؤخذ الاعتبارات عن تكلفة المواد المغذية nutrients التى يجب ان تكون رخيصة لذلك فانة من الافضــل استخدام المواد المغذية المتوفرة محليا سواء المواد الخام غير المكلفة او منتجات الــنفايات. لقد تم اقتراح عدد كبير من المواد الفعالة لانتاج Bt (ولماج ، كوريا وكاليجوس - موراليس ١٩٩٠) كما فة جدول (٦-١).

جدول(٦-١): امثلة عن المكونات المحلية لبيئات الباسيلليس والمتوفرة فى الدول النامية

- السوائل: لبن جوز الهند - سكر خام - مولاس - سائل الذرة
- نتروجين غير معنوى: كبريتات الامونيوم
- مـــواد نباتـــية المصـــدر: بذور البقوليات وغيرها مثل فول الصويا والقطن ... ، الحـــبوب مـــثل الذرة ودقيق القمح ، كربوهيدات ، دكسترين ، مالتوز ، سكروز ، جلوكـــوز ، مستخلصـــات نباتـــية ودرنات بطاطس ، جذور البطاطس ... الخ ، الكاسافا ، بطاطا ، اليامة.
- مواد حيوانية (غير ثديية) المصدر مثل دقيق السمك
- مواد ثديية المصدر مثل الدم وبقايا ذبح الدواجن

بالنســـبة لبيئة B. sphaericus تركز المجهودات فى الانتاج المحلى فى البحث عن المـــواد الخـــام المـــتاحة محليا لعمليات التخمر وقد تحققت نجاحات كبيرة فى هذا الاتجاه. بعض الامثلة موجودة فى جدول (٦-٢) (Bhumiratana ١٩٩٠).

جـــدول (٦-٢): بعـــض امـــثلة المواد الخام التى تستخدم فى تجهيز بيئة التخمر للانتاج المحلى للباسيلليس سفيركس B.T.I.

المواد الخام	ملاحظات ومصدر الدراسات المرجعية
* منتجات زراعية: فول البامبرا ، لوبيا ، فول سودانى ، فول الصويا	يـــتم استخلاص هذة المواد فى ماء مغلى ثم تضـــاف لاساس البيئة التى تحتوى على دم بقرى مجفف واملاح معدنية. (Obeta and Okadior ١٩٨٣).
ذرة ودقيق بذرة القطن ، كاسافا ، يامز	Vandekar and Dulmage, 1983
* منـــتجات حيوانية: دم - عظام - اجزاء دواجن ومخلفات حيوانية	Vandekar and Dulmage, 1983 Hertlein et al., 1981
* نواتج ثانوية صناعية: نواتج من مصنع تحضير المونو صوديوم جلوتامات	Dharmsthiti, Pantuwatana, and Bhumiratana, 1985
* مـــواد اخرى: لبن جوز الهند ، معجون الذرة مولاس	Vandekar and Dulmage, 1982

معظـــم الدراســـات المرجعية استهدفت الحصول على نمو ميكروبى مشابة او اعلى ممـــا يتحصـــل علية فى البيئات المعملية الروتينية. المواد الخام المستهدفة تشتمل منتجات زراعـــية. يجب ملاحظة ان النواتج الثانوية ذات المحتوى العالى من السكر مثل المولاس

غـــير مناسبة فى مزارع الباسيلليس اسفيريكس لان هذة البكتريا لا تستخدم السكر. فى كل الـــتقارير امكـــن تحقيق محصول عالى من الخلايا. تجهيز بعض البيئات يتطلب معاملات سابقة مكثفة مثل الاستخلاص او التحلل المائى. على العكس فان تجهيز بيئة الكربوهيدرات التى اقترحت بواسطة Dharmsthiti واخرون (١٩٨٥) حققت وتملك ميزات عديدة:

١. سهولة تجهيز البيئات دون الحاجة لمعاملات مسبقة لاى من المكونات
٢. البيئة تعضد حدوث نمو عالى وسمية الباسيلليس اسفيريكس.
٣. تكلفـــة المـــادة الخام الاساسية للتخمر متناهية الرخص لانها عبارة عن نفايات من صناعة التخمر او نواتج ثانوية فى هذة الصناعة.

استخدام البيئة المجهزة من النواتج الثانوية الصناعية قد تنتج فى تذبذبات او تغيرات غذائـــية اعـــتمادا علـــى جـــودة المادة الخام من قطفات المصنع. هذة المشكلة يسهل حلها والتغلـــب علـــيها مـــن جـــراء تقدير كمية L-tyrosin فى كل تحضيرة من مواد المصنع (ويطلـــق علـــيها HDL) وعمـــل تخفـــيف مناســـب. فترات اختبار L-tyrosine ليست بالضـــرورة ان تـــتكرر كثيرا حيث ان كل تحضيرة من HDL تنتج بكمية كبيرة ويمكن تخزيـــنها لفـــترات طويلـــة ومعقدة. لذلك فان الاختلافات الصغيرة فى مختلف تحضيرات المصنع لن تخلق صعوبات او مشاكل فى عملية التخمر حتى مع التوسع فيها.

التخمر Fermentation:

- تخمر السلالات المختلفة من B. sphaericus, B.t. بصرف النظر عن تحت النوع لها مواصفات عامة شائعة. كما ذكر اعلاه فان لها متطلبات غذائية متشابهة ولو ان الســـلالات كـــل علي حدة لها تعريف مميز كما ان البيئة التى تعضد النمو الجيد او انـــتاج التوكسين فى سلالة ما قد لا تناسب سلالة اخرى (دلماج ١٩٧٠ ، ١٩٧١ – سلامة واخرون ١٩٨٣ أ ، ب – سلامة وفودة ١٩٨٣ و سميث ١٩٨٢). بناء على البـــيانات المـــتاحة فيما يتعلق بالمواد الخام لانتاج B.sphaericus B.T. فقد امكن الاســـتنتاج ان البدائل المناسبة والمتوفرة لبيئة المعمل يمكن ان تجهز بسهولة. لذلك فـــان توفـــر مـــادة خـــام رخيصة لا تمثل عقبة كبيرة فى محاولات الانتاج المحلى للبكـــتريا. القوة الدافعة لتحضير قدرات الانتاج المحلى ليست فى جعل المنتج متوفرا خـــلال فترة قصيرة نسبيا فقط ولكن تقليل نفقات النقل كذلك زيادة فترة الثبات وتقليل

التكالـيف مما يجعل المادة المنتجة محليا قادرة على المنافسة فى الجودة والسعر مع المنتج المستورد.

- حيـث ان تكلفـة المخمـر كبـير الحجـم عالية جدا على قدرات الدول النامية فان الامكانـيات المتوفرة فى الوقت الراهن فى المعمل ذات سعات ٢٠٠ لتر. لذلك فان دراسـة امكانـية تطويـر نظـم تخمـر عالية الكفاءة للانتاج المحلى لبكتريا .B sphaericus, B.t.i. اتـبع لانـتاج محصول خلايا كبير عما هو الحال مع النظام التقلـيدى للتخمر المغمور. التجارب المبكرة عن انتاج .B.t.i استخدمت نظم تخمر تغذيـة القطفـة Fedbatch و الفصـل بالاغشية dialysis. من احد المشاكل التى تحـدث بسـهولة هو تلوث النظم خاصة تلك المتعلقة بالفصل الغشائى. المشكلة فى الـتلوث انهـا سوف تتفاقم مع محاولات زيادة سعة وقدرات الانتاج. لذلك صممت التجارب في محاولة لاجراء تدوير للخلايا مع نظام الغشاء المرتبط فى انتاج .B.t.i و.b سـفيريكس. لقد فقد النظام بتنمية البكتريا فى مخمر تقليدى. بعد ٢٤ ساعة من فـترة الـتخمر تم تجهيز اربعة لتر من المزارع خلال غشاء المليبور المثقب (حجم المسـام ٠,٤٥ ميكرون) فى وحدة الترشيح. ثم استبعاد الراشح ثم يعاد تدوير الخلايا مـرة اخـرى فى المخمر. بعد ذلك تم اضافة ٤ لتر من البيئة الطازجة المعقمة من نفـس التركيـب الى المخمر للحصول على نفس الحجم الاصلى ٦ لتر. يتم تكرار دورات تدويـر الخلـية بـنفس الاسلوب بعد ٢٤ ، ٤٨ ، ٧٢ ، ٩٦ ، ١٢٠ ساعة وصـلت تخمـير. البيانات الموجودة فى جدول (٦-٣) توضح انه بعد فترة تشغيل النظم دورات او ١٢٠ ساعة اعداد الخلايا الخضرية والجراثيم الى ١×١٠^١٢ خلية / ملليلـتر ، ٥,٩×١٠^١١ جراثـيم/ملليلـتر على التوالى. اذا قام البعض باستخدام هذة البـيانات فـى حسـاب الانتاجية بناء على محصول الخلايا و/او الجراثيم فى اليوم يظهر بوضوح ان الانتاجية باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا اعلى كثيرا من نظام التخمر المغمور ذو القطفة التقليدى.

جدول (٦-٣): انتاج .B.t.i باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا

الدورة	الوقت (ساعة)	الحجم (لتر)	عامل التركيز	عدد الخلايا الحية	عدد الجراثيم
1	24	6	none	-	-
	24	2	3 X	2.8 X10^{11}	2.3X10^{9}
2	48	6	None	-	1.6X10^{10}
	48	2	3 X	-	7.5X10^{10}
3	72	6	None	-	-
	72	2	3 X	7.0X10^{11}	4.9X10^{10}
4	96	6	None	–	-
	96	2	3 X	2.1X10^{12}	7.0X10^{9}
5	120	6	None	-	-
	120	2	3 X	1.0X10^{13}	5.9X10^{11}

- امكن الحصول على نتائج متشابهة عندما استخدمت بكتريا B. sphaericus (جدول ٦ -٤). بالرغم من ان الانتاجية المحصولية كانت منخفضة عنه فى حالة بكتريا B.T.I. . هـذا قـد يرجع الى الاختلاف فى حجم ومسارات التمثيل بين هذين الكائنين. علاوة علـى ذلـك فـان الباسيلليس سفيريكس كانت اكثر حركة فى البيئة بالمقارنة ببكتريا B.T.I. اعـداد الخلايـا الخضـرية والجراثيم زادت بالتوازى مع الكفاءة على يرقات البعوض.

جدول (٦-٤): انتاج بكتريا باسيلليس سفيركس باستخدام نظام المادة تدوير الخلايا

الدورة	الوقت (ساعة)	الحجم (لتر)	عامل التركيز	عدد الخلايا الحية	LC50 cuf/ml vs. Cx-quin*
1	24	6	none	2.9X10^{7}	1.2X10^{3}
	24	2	3 X	7.0X10^{7}	4.2X10^{3}
2	48	6	None	4.0X10^{7}	2.8X10^{4}
	48	2	3 X	7.5X10^{9}	1.2X10^{4}
3	72	6	None	7.0X10^{7}	1.9X10^{3}
	72	2	3 X	1.0X10^{8}	3.9X10^{2}
4	96	6	None	7.8X10^{8}	1.6X10^{3}
	96	2	3 X	1.2X10^{9}	1.6X10^{2}
5	120	6	None	9.4X10^{8}	1.7X10^{3}
	120	2	3 X	2.3X10^{9}	4.4X10^{3}

*cfu = colony forming unit; Cx. Quin = Culex quinquefasciatus

لقــد اســتخدمت نواتــج التحلل الثانوية فى مصانع المونو صوديوم جلوتامات L-lysine, بنجاح فى انتاج بكتريا .B.t.i و .B سفيركس مع تحويرات بسيطة فى المكونات. شملت التحويرات تعديل الحموضة على ٧,٥ مع ٠,٠٥% k_2HPO_4 (فوسفات البوتاسيوم احــادى الايدروجين). البيئة التى طورت لزراعة .B.t.i كانت تتكون من ٤% ناتج ثانوى مــتحلل عطــرى من مصنع المونو صوديوم جلوتامات بينما استخدام ٧% من هذا السائل لزراعة B. sphaericus فى حالة .B سفيريكس ثم اضافة مستخلص الخميرة بكمية تجعل التركــيز النهائى يصل الى ٠,٠٥%. استخدام نظام اعادة تدوير الخلايا اثبت افضلية عن نظام تغذية التحضير Fed batch او نظم الفصل الغشائى. افضل نظام اعادة تدوير الخلايا تعتمد على حقيقة ان محصول الخلية وكذلك انتاجية النظام كان عاليا ولم تكن هناك مشــاكل مــن التلوث بعد العديد من الدورات المتكررة كما كان النظام تحت السيطرة مع سهولة التحكم في مدخلاتة ومخرجاتة. اوضحت التجارب الاولية على مخمر سعة ٥٠ لتر ان المحصــول الذى تحصل عليه باستخدام نظام اعادة تدوير الخلايا كان فعالا بنفس القدر مــع المخمر بسعة ٥ لتر. اتضح ان استخدام نظام اعادة تدوير الخلايا يصلح للتطبيق مع الانــتاج المحلــى للبكتريــا B.t.i. B. sphaericus على المستوى الصناعى. مازالت هناك حاجة لمزيد من التطوير.

المستحضر Formulation:

حيــث ان الانواع المختلفة من الكائنات المستهدفة ذات سلوك واماكن معيشة مختلفة فانــه تكــون هناك حاجة لمستحضرات مناسبة تتلاءم مع خصائص وصفات هذة الكائنات والموافــع. لقــد تــم تطويــر مستحضرات عديدة وتقييمها ضد بعوض الانوفيلس ويرس والكيولــيكس بانواعــة المخــتلفة فى المعمل والظروف الحقلية. لقد اتضح ان مستحضر القوالــب الطــافى يعطى فعالية جيدة على سطح الماء لفترة تصل الى ٢١ يوم او اطول. الصــورة المحببة تعطى نشاط جيد فى مناطق الخضرة الكثيفة لانها تنتشر وتخترق سطح الماء بشكل جيد وملائم. لقد وجد ان الاثر الباقى الفعال للمركب المنفرد من الحبيبات على سطح الماء يدوم ٦ ايام تحت الظروف الحقلية بسبب معدل الغرق الى القاع. المادة الحاملة الــتى تســتخدم فــى هذين المستحضرين كانت قشور جوز الهند المطحونة وقوالح الذرة المطحونــة والــتى جففــت تماما. مادة الربط لعمل القوالب هناك كانت من صمغ شجرة المطاط. كان يجرى خلط المادة الحاملة والصمغ بمعدل ٢:٣ وتضغط على ضغط ٥٠٠٠

رطل/مساحة السطح باستخدام الضغط الهيدروليكى. وبعد تجفيف القوالب كانت تغمس فى معلـق بيـئة مـزرعة البكتريا المتحصل عليها من المخمر ثم تجفف على درجة حرارة الغـرفة. كانـت تجـرى دراسات متقدمة لتحديد الظروف المناسبة لانتاج منتجات عالية الفعالية.

القياسية Standardization:

فـى الوقـت الراهـن يكـون من الصعب جدا التعبير عن الدلتا-اندوتوكسين فى المستحضـر علـى اساس وزن التوكسين بسبب انه لا يوجد تحليل كيميائى مباشر للدلتا-اندوتوكسـين. تنقية الدلتا-اندوتوكسين بحيث يكون خالى من الجراثيم من الامور الصعبة جدا، لذلك فان قياس كفاءة المادة التى تحتوى على التوكسين والتعبير عن الفاعلية بوحدات الفعـل الابادى المشتقة من مقارنة فعالية العينة بالمقارنة بالمستحضر القياسى يعتبر السبيل والهـدف. عندئذ يعبر عن الكفاءة بالوحدات الدولية (IU) International units فى حالة مستحضـرات تحـت الـنوع كورسـتاكى او بوحـدات السـمية الدولـية (ITU) او International toxicity units فـى حالة مستحضرات تحت النوع اسرائيلينسيز (H-14). يجب اخذ تجانس الانتاج والمنتج فى الاعتبار.

REFERENCES

Barjac, H. de. (1987a). A new candidate for biological control of mosquitoes: Bacillus thuringiensis var. israelensis. Entomophaga, 23, 209-219.

Barjac, H. de. (1987b). Toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis for larvae of Aedes aegypti and Anopheles stephensi. C.R. Acad, Sci. (Paris), 286 D, 1175-1178.

Barjac, H. de. (1987c). Une nouvelle variete de Bacillus thuringiensis tris toxique pour les moustiques :Bacillus thuringiensis var. israelensis serotype, 14. C.R. Acad. Sci. (Paris). 286 D, 797-800.

Bhumiratana, A. (1990). Local production of Bacillus sphaericus. Ch. 17 in "Bacterial Control of Mosquitoes and Black flies :Biochemistry, Genetics and Applications of Bacillus thuringiensis israelensis" ed. By H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutger University Press, New Brunswick., 272-283.

Brown, A.W.A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes :a progmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc., 2, 123-140.

Dharmsthiti, S.C. ; Pantuwatana, s. and Bhumiratana, A. (1985). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis and Bacillus sphaericus 1593 on medis using a by-product from a monosodium glutamate factory. J. Invertebr. Pathol., 46, 231-238.

Dulmage, H. T. (1970). Production of the spore-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 16, 385-389.

Dulmage, H. T. (1971). Production of delta-endoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis,* serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 18, 353- 358.

Dulmage, H.T. and Barjav, H., de. (1973). HD-187 : A new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produces high yields of delta-endotoxin. J. Invertebr. Pathol., 22, 273-277.

Dulmage, H. T. et al. (1981). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In "Microbial

Control of pests and plant diseases, 1970-1980." Ed. H.D. Burges, Academic Press : London., 191-220.

Dulmage, H.T. ; Correa, J.A. and Gallegos Morales, G. (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* through standardization and fermentation Development. Ch. 8 in "Bacterial Control of Mosquitoes and Black flies : Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* israelensis" ed. By H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutger University Press, New Brunswick., 110-113.

Hertlein, B. C. ; Hornby, J. ; Levy, R. and Miller, T. W., Jr. (1981). Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. Dev. Industr. Microbiol., 22, 53-60.

Kalfon, A. ; Larget-Thiery, I. ; Charles, J. F. and Barjac, H., de (1983). Growth, sporulation and lavicidal activity of *Bacillus sphaericus* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 168-173.

Kalfon, A. ; Charles, J. F. ; Bourgouin, C. and Barjac, H., de. (1984). Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : An electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. J. Gen. Microbiol., 130, 893-900.

Massie, J. ; Roberts, G. and White, P. J. (1985). Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from the soil by use of acetate as the only major source of carbon. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1478-1481.

Niishiitsutsuji-Uwo, J. ; Wakisaka, K. and Eda, M. (1975). Sporeless mutants of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 25. 355-361.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; El-Sharaby, A. and Selim, M.H. (1983a). A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. Entomophaga. 28, 151-160.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Selim, M.H. and El-Sharaby, A.M. (1983b). Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-

products in production of spores and bilolgically-avtive endotoxins from *Bacillus thuringiensis.* Zbl. Microbiol., 138, 553-563.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and Dulmage, H.T. (1983). Novel fermentation media for production of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis.* J. Invertebr. Pathol., 41, -19.

Service, M. W. (1983). Biological Control of Mosquitoes-has it future? Mosquito News. 43 : 113-120.

Smith, R.A. (1982). Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Can. J. Microbiol., 28, 1089-1092.

Wakisaka, Y. ; Masaki, E. ; Koizumi, Y. ; Endo, Y. ; Nishimura, M.S. and Nishiitsuji-Uwo, J. (1982). Asporogenous *Bacillus thuringiensis* mutant producing high yields of delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1498-1500.

Wakisaka, Y. ; Masahi, E. and Nishimoto, Y. (1982). Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-B-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis.* Appl. Environ. Microbiol., 43, 1473-1480.

Yamamoto, T. and Mclaughlin, R. E. (1981). Isolation of protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larvae, *Aedes taeniorhynchus.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 414-521.

Yousten, A.A. ; Wallis, D.A. and Singer, S. 1984. Effect of oxygen on growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus* 1593. Curr. Microbiol., 11, 175-178.

Yousten, A.A. ; Madehekar, N. and Wallis, D. (1984). Fermentation conditionsis and Bacilowth sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus aphaericus.* Dev. Industr. Microbiol., 25, 757-762.

Yousten, A.A. ; Fretz, S.B. and Jelley, S.A. (1985). Selective medium for mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus.* Appl. Environ. Microbiol., 49, 1532-1533.

ثانيا: تطوير عملية انتاج عالى للمبيدات الحيوية بواسطة الباسيلليس ثورينجينسيز.

يوجد سببين او عاملين اساسيين يتحديا الاستخدام الواسع للباسيلليس ثورينجنيسيز B.t. فى الدول النامية الا وهما: المناورة manipulation والسعر. العامل الاول يتطلب اناس مدربين ذوى خبرة ومعرفة عن بيولوجية الافة وكذلك استراتيجيات معروفة جيدا فى برنامج المكافحة المتكاملة للافات وسبل ادارتها بينما العامل الثانى تتمثل فى اجراء البحوث لتقليل تكاليف عملية انتاج B t. هذا ولو ان استخدامات بكتريا Bt سوف تتعاظم وتزداد فى المستقبل القريب بسبب الضغوط الشديدة من قبل رجالات البيئة واتفاقيات تحرير التجارة العالمية وزيادة مشاكل تطور ظاهرة مقاومة الافات لفعل المبيدات التقليدية. فى اتجاه الانتاج على المستوى التجارى للمبيدات الحشرية من بكتريا Bt ثم تطوير تكنولوجيا تخمر مغمور بالرغم من ندرة توفر ايه معلومات عامة لدى الناس حتى صدور اول حقوق ملكية لهذة التكنولوجيا. من جهة اخرى تم اجراء قليل من الجهد فى اتجاه تنقية المواد الوسيطة وظروف التخمر بهدف زيادة المحصولية بالاضافة الى قليل من الدراسات لتحليل جدوى العملية (Rowe and Margaritis ١٩٨٧). لذلك استهدف هذا البحث دراسة ظروف الوسائط والتخمر بما يحقق زيادة المحصول الناتج والفاعلية ووضع خطوات عملية التصنيع ومعايير توسيع مدى الانتاج.

مواد وطرق الدراسة:

بداية تم الحصول على سلالة Bt كورستاكى HD-73 من معمل بحوث القطن فى براونفيل وتكساس. السلالة كانت في حضانة على اجار مغذى مائل. ببيئة المزرعة (قطعة ومزرعة مستمرة) كانت تحجز تبعا لوصف Urguijo ١٩٨٧. بالنسبة لتجارب القطفة المغذاه Fed batch استخدمت ببيئة مركزة خمسة مرات. العدوى لوحدات التخمر كانت تنمو فى دورق معيارى وتحضن لمدة ٧ ساعات على درجة حرارة ٣٠م°. استخدمت عدوى ٢% (حجم/حجم). اجرى التخمر على درجة حرارة ٣٠م° ودرجة حموضة ٧ وانهى التخمر عندما تم تجرثم اكثر من ٩٠% من الخلايا. استخدم فى المعمل وحدة تخمر سعة ١٤لتر نموذج CFS-314 . لقد كان المخمر ذات قطر ٨٠,١ سنتيمتر ومفاعل قلاب HLD = ١,٨٧ وحجم شغل ٧٠٠٠ لتر. لقد اجرى تنفيذ تجارب القطفة المغذاه فى مخمر سعة ١٤ لتر مع انسياب ابتدائى ١ لتر/ساعة ومعدل انسياب متغير ١ لتر/ساعة^{٢}. بالنسبة لمعدل نقل الاكسجين وKLa اتبعت الطريقة المتوازنة التى وصفت بواسطة Murkopadhyay and Ghose (١٩٧٦). بالنسبة لاختبار الطرد المركزى استخدم

جهـــاز الطرد المركزى وتسيفا لايا نموذج SA 1-02-1752 مع مساحة مكافئة ١٣٨٢م[٢].
بالنســـبة لاختـــبار الترشيح استخدم اختبار ورق الترشيح ايمكو مع سطح ترشيح او قدم[٢].
بالنســـبة لطـــريقة التحلـــيل تم تقدير الكتلة الحيوية للبكتريا عن طريق عدد الكلى للخلايا ومضاعفاتها بواسطة وحدة وزن الخلايا (٢,٥×١٠[١٢]جم/خلية). ثم تحليل الجلوكوز بطريقة DNS (Miller ١٩٥٩). ثم عد الجراثيم فى حجرة Neubauer. محصول الكتلة الحيوية كان يعتمد على استهلاك الجلوكوز.

النتائج والمناقشة:

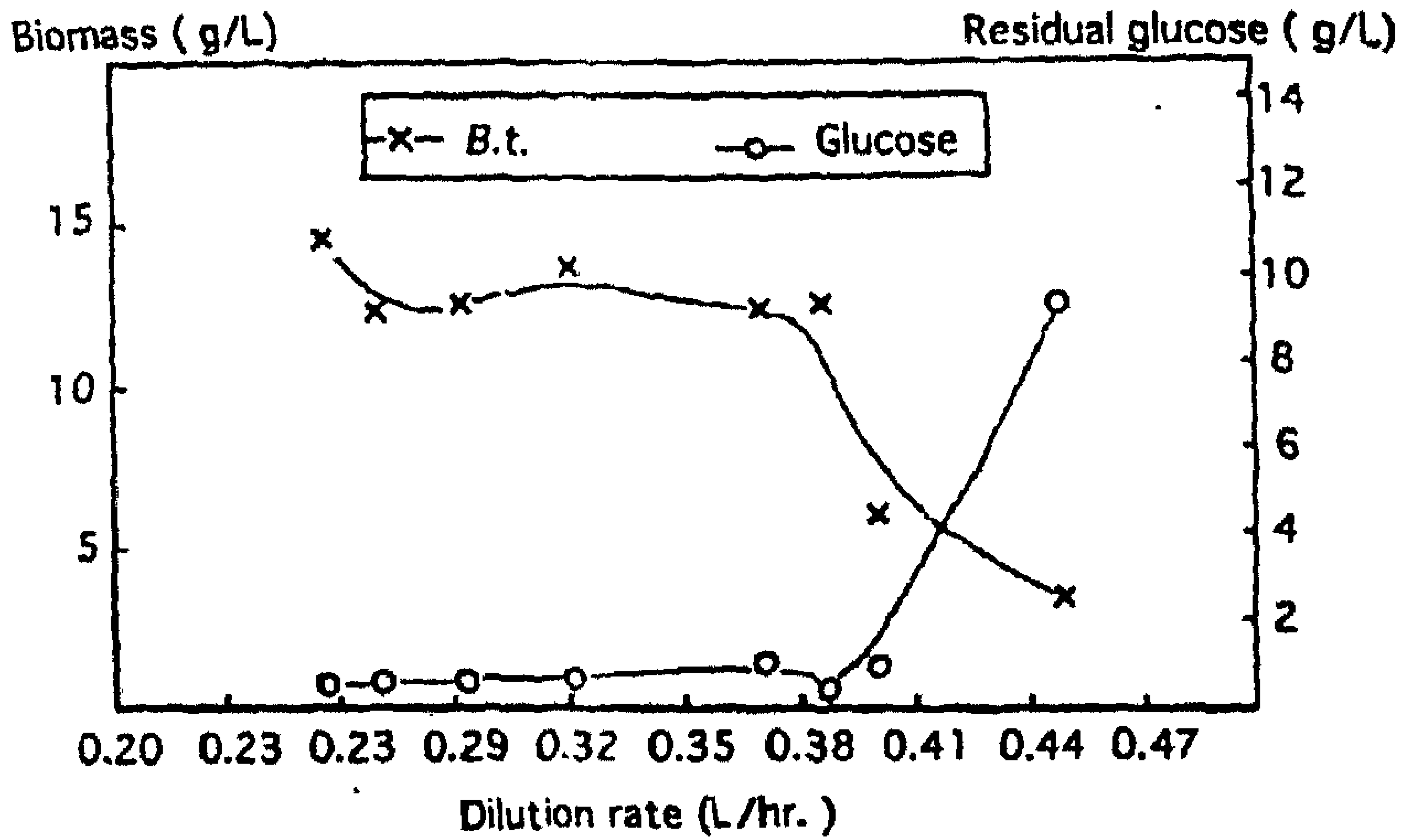
اجريـــت الدراسات فى البداية على موائمة بيئة المزرعة وظروفها. لقد كان الهدف الاساســي اســتخدام مصدر بروتين رخيص (de urquijio ١٩٨٧). لقد كان فى الامكان الوصـــول الى تركيز خلوى ١٣,٤ جم/لتر مع ٩٠% تجرثم ووقت كامل كلى للتخمر ٢٥ ساعة. وجد معدل البلورات/الجراثيم ١:١ والمنتج (المواد الصلبة الباقية من الخميرة وبقايا الخلايـــا والبللورات والخلايا) كان ذات سمية CL_{50} = ١٦٦ ميكروجرام/سم[٢] ضد حشرة ماندوكا سيكستا (Razo ١٩٩١).

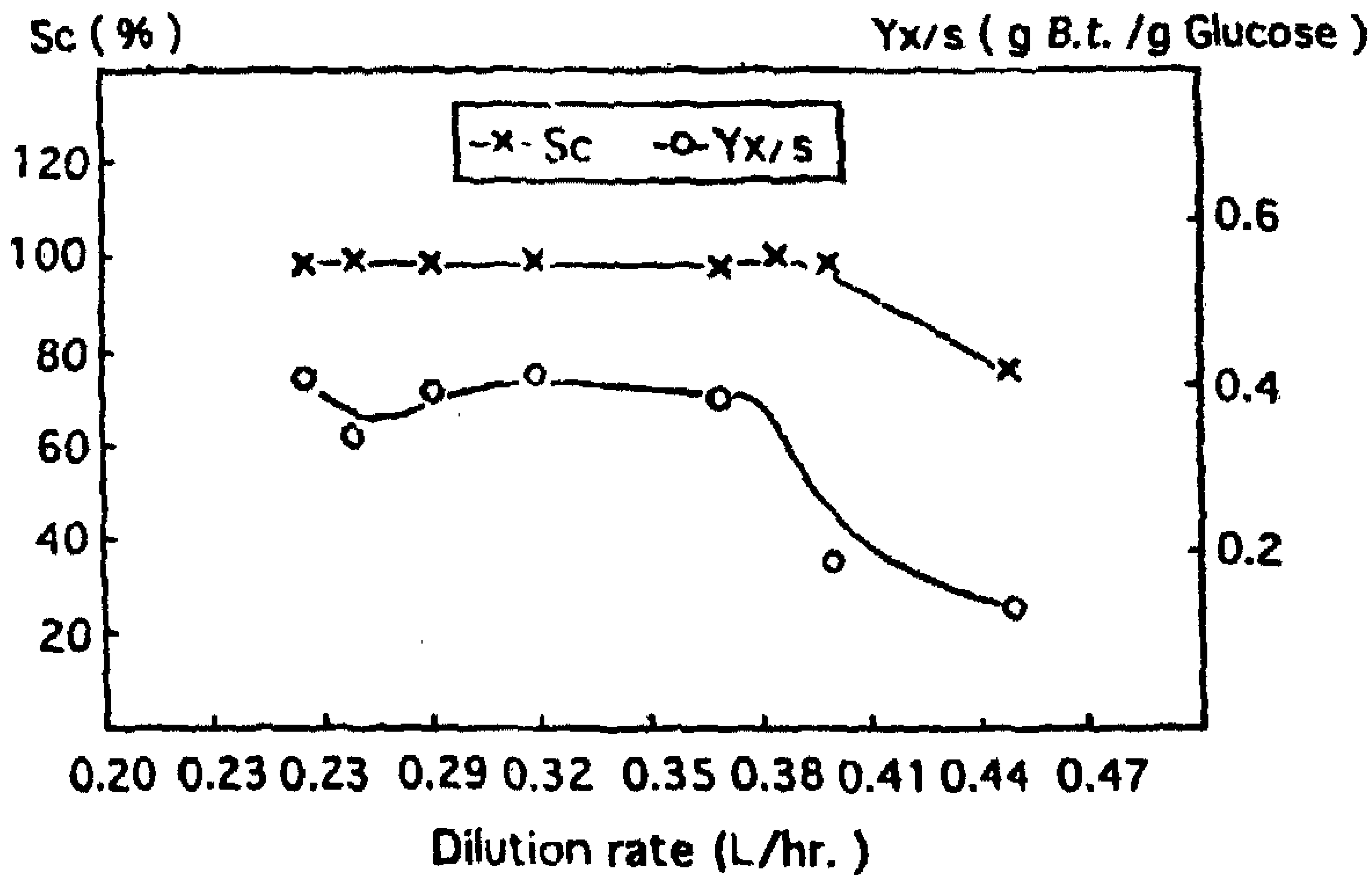
المزرعة المستمرة:

لكـــى نحصل على معايير الجودة والانتاجية للباسيلليس B.t. النامية على الجلوكوز تـــم اجـــراء تجـــارب الفروع المستمرة. الرسم X-D اوضح ان B.t. ذات حالات تمثيلية مخـــتلفة لمعدلات تخفيف (D) من او وحتى ٠,٥٩ h^1 ، عند تخفيف D = ٠,٢ H^1 كانت هـــناك خلايـــا وخلايـــا متجرثمة وجراثيم حرة (Rodriguez ١٩٩١). لقد نشرت نتائج متشـــابهة ســـابقة للباسيلليس سبتيليس (Dawes and Thorley ١٩٧٠). للحصول على حـــركة الخلايا الخضرية النامية على الجلوكوز تم اختيار فترات (D) ٠,٢٥ وحتى ٠,٤٥ h^1 (الشـــكل ٦-١). بـــيانات محصول الكتلة الحيوية الموجودة فى المراجع شديدة القياسية وحتى تقارير البحاث اشارت الى فترات عريضة حيث كانت هناك قيم اعلى واقل من٠,٥ .القيم متناهية الارتفاع توضح ان B.t. تستخدم مصدر كربون اخر بالاضافة الى الجلوكوز بيـــنما القيم القليلة تقترح تراكم بعض منتجات التمثيل. Rowe ١٩٩٠ وجد ان B.t. يراكم البيروفات والبيوائيرات والكتات والاسيتات والبولى بيتا هيدروكسى بيوتيرات تحت مختلف ظـــروف التربـــية. اكـــثر مـــن ذلك فانها قادرة على تمثيلها كما هو الحال مع الاحماض الامينـــية. لذلك فانه من الممكن حدوث الاختلاف الكبير فى Yx/s ومعدلات النمو الخاصة المرتبطة باستخدام المواد الوسيطة المنظمة المختلفة وتراكم نواتج التمثيل. هذا بالرغم من

ان معظـــم دراســـات التربية للباسيلليس B.t. لا تاخذ فى الحسبان تراكم نواتج التمثيل او استهلاك مصادر الكربون المختلفة.

فـــى الدراســـات التى اجراها كاتبو هذة المقالة وجد ان Yx/s للجلوكوز تختلف فى وظـــيفة معدل التخفيف ولكن لاختيار الفترة او للفترة المختارة تكون ثابتة وقوية من ٠,٥٠ الاكســـجين الحقـــيقى الناتج (Yo_2) كانت ٠,٧٣ جم خلية/جرام اكسجين والطاقة المصانة كانت ٠,٠٦٥ جرام جلوكوز /جم خلية / ساعة.





شكل (٦-١): رسم X-D للباسيلليس ثورينجنسيز

جدول (٦-٥): معايير الحركة للباسيلليس ثورينجنسيز

Variety الصنف	$Y_{x/s}$	μ_{max} (1/h)	k_s (mg/ml)	المصدر
Kurstaki 1990	0.56-1.98	0.6-1.1	-	Anderson
Kurstaki	0.30-0.52	0.47-0.77	-	Arcas 1987
Berliner	-	0.29-0.83	-	Goldberg 1980
Thuringiensis	-	0.70-1.90	1.8.2.0	Holmberg 1980
Kurstaki	0.60-0.67	0.48-0.51	-	Rowe 1990
Kurstaki	0.32-0.41	0.60-0.78	-	This work
[a]kurstaki	[b]0.43	1.21	0.48	This work

[a] continuous culture – [b] true yield for glucose

مزرعة القطفة المغذاه Fed Batch Culture :

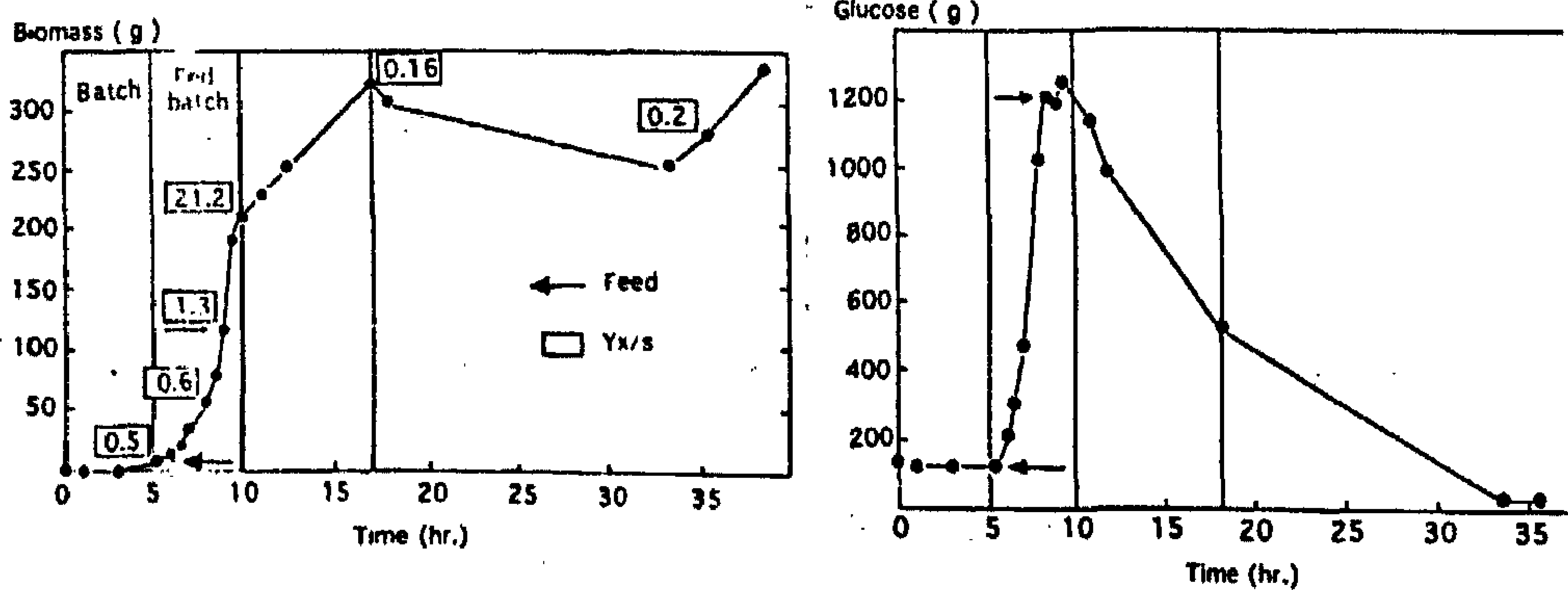
معايير الحركة للبكتريا B.t. النامية على الجلوكوز قد استخدمت لمضاهاة القطفة المغذاة لكى نحصل على افضل ظروف التغذية (معدل الانسياب وتركيز المواد المغذاية) للحصول على اقصى انتاجية للكتلة الحيوية تبعا لنظام التخمر. لقد تم اختيار الانسياب الخطى والنتائج التى اسفرت عنها الدراسة موجودة فى الشكل (٦-٢). خلال مزرعة القطفة لم يستهلك الجلوكوز ولكنه تراكم خلال مرحلة التغذية ومن ثم افترض ان البكتريا تمثل مادة وسيطة اخرى قد تكون الاحماض الامينية والبيوتيرات. النمو الاساسى قد تبعة النمو الخطى وخلال هذة المرحلة الاخيرة كان الجلوكوز تميل انه لا يستهلك فى نهاية مرحلة النمو. لذلك حدثت اطالة لمرحلة التجرثم وقد اوضحت الدراسات المبكرة ان الجلوكوز المتبقى كان له هذا التاثير (de ureguijo ١٩٨٧). لقد اجريت تجارب اخرى عن القطفة المغذاه مع استبعاد الجلوكوز من التغذية والنتائج مدونة فى الجدول (٦-٦). فى كل الحالات كان التخمر ينتهى عندما تجرثم اكثر من ٩٠% من الخلايا. فى مزرعة القطفة المغذاة وبدون جلوكوز التغذية ثم الحصول على ٢,٧ × ١٠^١٠ جراثيم/ملليلتر فى ٢٣,٥ ساعة. هذة النتائج مشابهة لتلك التى اعلنت بواسطة Areas واخرون (١٩٨٧). سمية المنتج ضد ماندوكا سيكستا كانت مخالفة لمنتج القطفة.

جدول (٦-٦): مقارنة بين مزارع بكتريا Bt بطريقة batch والقطفة المغذاة.

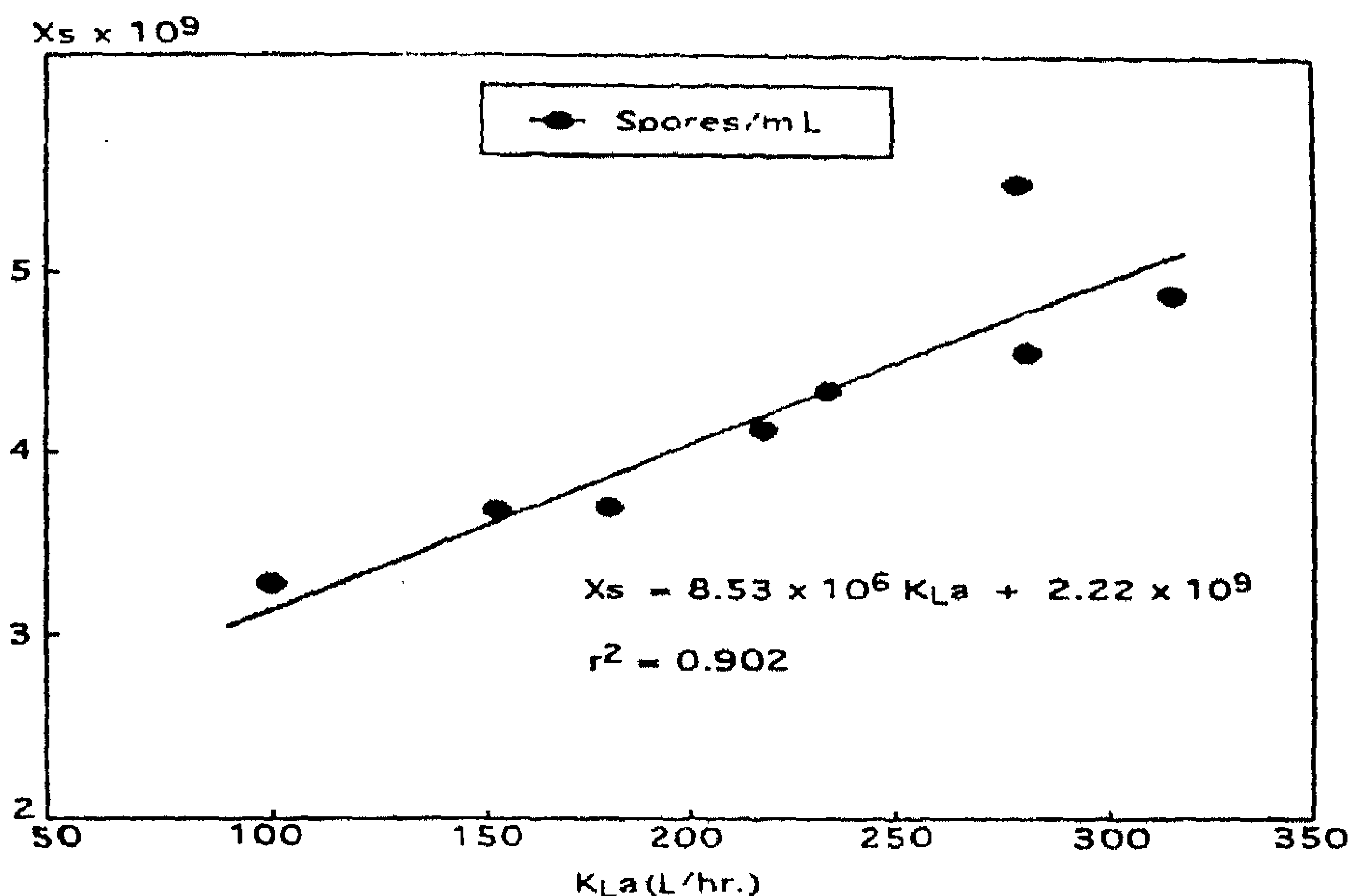
طريقة التحضير	Biomass (g/L) الكتلة الحيوية	Biomass productivity (g/L-h)	Time (h)
Batch	13.4	0.53	25
Fed batch simulation	49.8	1.99	25
Fed batch with glucose feeding	27.7	0.72	38.5
Fed batch without glucose feeding	23.5	0.92	25.5

زيادة او توسيع الانتاج Scale Up :

لكـــي نســـتخدم K_{La} او معيار معدل انتقال الاكسجين (OTR) فان تاثير K_{La} على انتاج الجراثيم فى مزرعة القطفة قد درس. اظهرت النتائج علاقة وارتباط خطى (الشكل ٦-٣). الـتقارير الاولـى أظهـرت ان الاكســجين مهم لنمو وتجرثم B.t. (Holmberg واخـــرون ١٩٨٠، Anderson ١٩٩٠). لقــد تمت نقلة مقدرة مزرعة القطفة من مخمر ســعة ١٤ لتر الى ١١٠٠ لتر مع معدل نقل اكسجين ثابت (جدول ٦-٧). لقد كان تركيز الجراثــيم ووقــت التخمر متشابها ولو ان $y_{x/s}$ ومعدل النمو الاقصى الخاص كانت مختلفة وكذلــك فــترة مــرحلة الــتجرثم. المعـــيار الاخير كان اقصر للمخمر الاكبر. لقد وجد Holmberg واخـــرون (١٩٨٠) نقص فى معدل النمو الخاص لبكتريا B.t. عندما زادت مــن ٨ لـــتر حــتى ١٠٠٠ لتر فى سعة المخمر. لقد اجريت التجارب لمعرفة اسباب هذا السلوك.



شكل (٦-٢): مزرعة القطفة المغذاه للباسيلليس ثورينجنسيز



شكل (٦-٣): العلاقة بين انتاج الجراثيم و Kla للباسيلليس ثورينجنسيز

جـدول (٦-٧): زيادة الانتاج فى خلال توسيع عملية التخمر لبكتريا Bt تحت OTR * ثابت

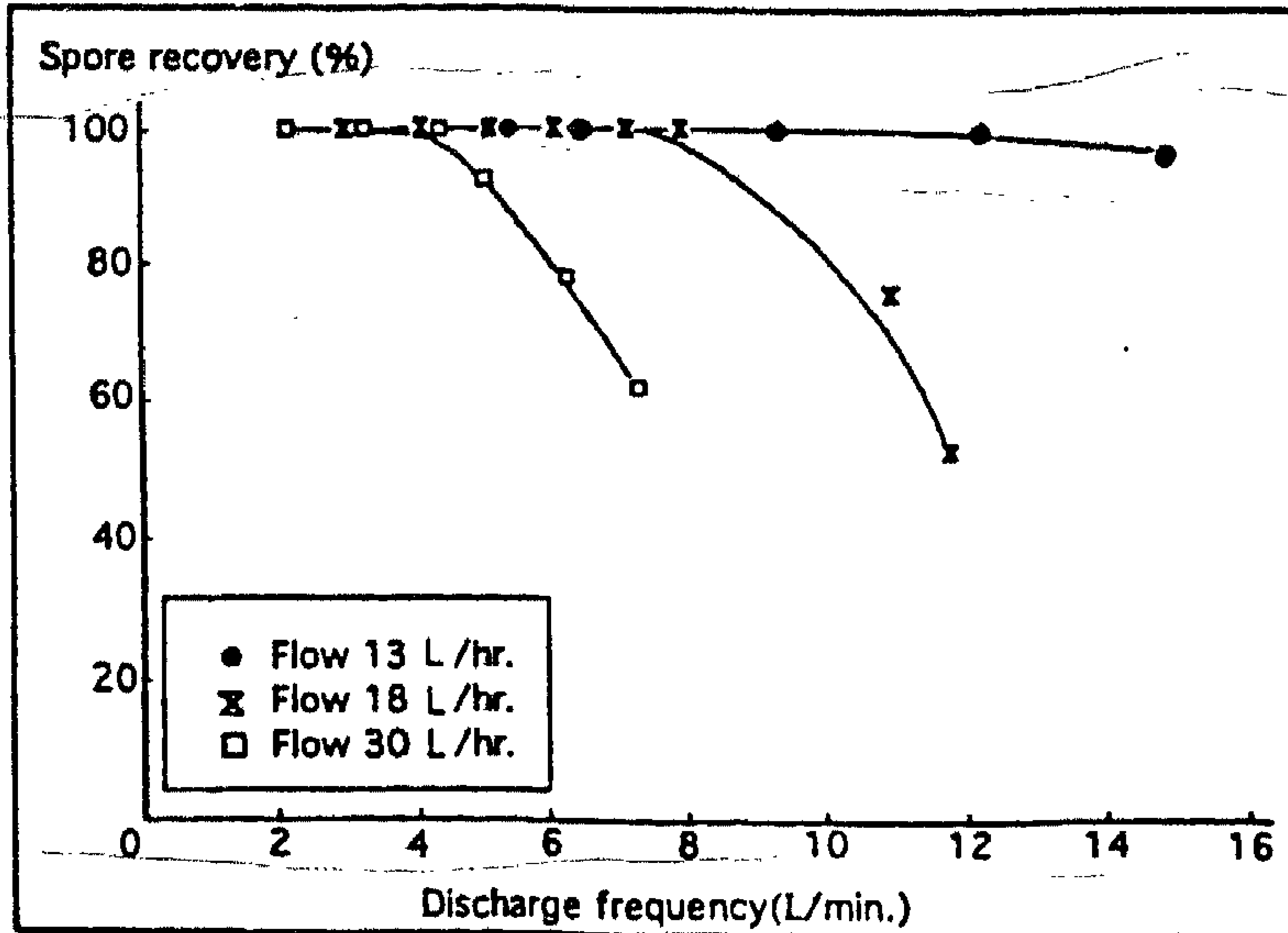
	14 L	1100 L
OTR (g/L-h)	1.75	1.73
Xe (spores/ml)	4.8×10^9	5.1×10^9
$X_{x/s}$	0.41	0.41
Pv (spores/L-h)	1.9×10^{11}	2.2×10^{11}
U (L/h)	0.78	0.67
Time (h)	25.5	23

* OTR = معدل انتقال الاكسجين Oxygen transfer rate

الاسترجاع Recovery:

لقد درست نظم استرجاع مختلفة كى تسترجع الجراثيم والبللوريات معا مع مخلفات الخلايـا والمـواد الصـلبة المتبقية. فى البداية تم دراسة تاثير درجة الحموضية والحرارة والمـواد المجمعة على معدل الترسيب الحرج للمواد الصلبة من البيئة المتخمرة. تحت كل الظروف المختبرة كان معدل الترسيب الحرج منخفض جدا والقيمة الافضل كانت مرتبطة بدرجـة الحموضة (٤). عند هذة الحموضة كان معدل كان الترسيب الحرج ١,٩ × ١٠^٨

م/ثانية بالمقارنة بقيمة ٧ × ١٠^٨ م/ثانية عند حموضة (٧). هذا التاثير نشر سابقا بواسطة Cords and Fisher (١٩٦٦). لذلك فانه لاغراض الاسترجاع كانت تحمض البيئة حتى درجـة حموضـة (٤). هـذه العملية لم تحدث اى تعديل فى سمية المنتج (Villafora ١٩٩٠). بالتبعـية اجريت العديد من التشغيلات على وحدة الطرد المركزى Westfalia (الشكل ٦-٤). لقد حدث تدهور فى اداء جهاز الطرد المركزى عند امتلاء فراغ الحمأة او المـواد الصـلبة المتخلصة. لقد تاكد هذا الوضع من فقد المادة الصلبة مع التيار المناسب ومن ثم نقصت كفاءة استرجاع المادة الصلبة. من جهة اخرى فان فترات الصرف قصيرة المـدة قللت من محتوى المواد الصلبة للتيار المركز. لذلك فان اختيار فترة صرف المواد الصـلبة هو الذى يفصل ويميز بين التصفية الجيدة والمحتوى العالى من المواد الصلبة فى الجهات المفصولة. لقد كان التركيز الاعلى ٧,٢ - ٧,٥ (DW) مع كفاءة استرجاع ٩٩% مـن الجراثـيم. لقد اشار زامولا واخرون (١٩٩١) ان المحتويات الصلبة ٩-١٥% وزن جاف عند استرجاع بكتريا Bt بالطرد المركزى. بينما هذة التركيزات اعلى من تركيزاتنا الا ان الفقـد (حوالى ١٢%) كان عالى ايضا. هذا قد يرجع الى الاختلافات فى مواصفات المواد الصلبة (حجم معبأ).



شكل(٦-٤): تاثير معدل الانسياب على كفاءة استرجاع الجراثيم للباسيلليس ثورينجنسيز

الترشيح Filtration:

معدل ترشيح البيئة كان بطيئا جدا بسبب سرعة انسداد سطح ورقة الترشيح بواسطة المـواد الصـلبة سـبية الكعك. لذلك تم مضاهاة مرشح برميلى مستمر الدوران باستخدام مرشـح ورقـة الاختبار مع شريط من البولى استر والديكالين ٤١٢٧ سابق التغليف. لقد امكن الحصول على افضل النتائج مع دورة ٨٤ ثانية (غمس ٣١ ثانية وتجفيف ٤٤ ثانية). تحت هذة الظروف كان معدل الترشيح ١٨٧,٢ لتر/ساعة-م٢ مع استرجاع جراثيم حوالى ٩٨,٥%. لقـد كان معدل الترشيح متشابها مع مانشر عن سترتبومايسيز فرادى وباسيلليس (Villafana ١٩٩٠).

REFERENCES

Anderson, T.B. (1990). Effects of carbon nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield bioinsecticidal crystal protein. M.Sc. thesis, University of Western Ontario, Canada.

Arcas, J. ; Yantorno, O. and Ertola, R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnol. Lett., 9 (2), 105-110.

Cords, H. and Fisher, R.A. (1966). Stable conentrate bacterial insecticide suspensions. USA patent 3 2 71 243.

Dawes, I.W. and Mandelstam, J. (1969). Biochemistry of sporulation of *Bacillus subtilis.* Continuous culture studies. In : Malek, I. ; Beyan, K. ; Fenel, Z. ; Munk, V. ; Ricica, J. and Smrkova, H. (eds.) Continuous Cultivation of Microorganisms. Acad. Press, 157-162.

Dawes, I.W. ; Kay, D. and Mandelstam, J. (1970). Sporulation in *Bacillus subtillis.* The theoretical and experimental studies in continuous culture systems. J. Gen. Microbiol., 62, 49-66.

Holmberg, A. ; Sievanen, R. and Carlberg, G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* of exotoxin production : Process analysis study. Biotechnol. Bioeng., 22, 1707-1724.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426-428.

Rowe, G.E. and Margaritis, A. (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis.* Crit. Rev. Biotechnol., 6 (1), 87-127.

Mukhopadhyay, S.N. and Ghose, T.K. (1976). A simple dynamic method pf k_La determination in laboratory fermenter. J. Ferment. Technol., 54, 405-419.

Razo, E. (1991). Estudios para el escalamiento de un proceso por lote de nivel de laboratorio a planta pilot para la produccion de *Bacillus thuringiensis.* M.Sc. thesis. Unam., Mexico.

De Urquijo, E. (1987). Produccion de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas agricolas y medicas de importancia en Mexico. M.Sc. thesis. Cinvestav. Mexico.

Villafana, J. (1990). Evaluacion de alternatives para la recuperacion de los productos entomopatogenos de *Bacillus thuringiensis*. M.Sc. thesis, Cinvestav. Mexico.

Zamola, B. ; Valles P. ; Melig, Miccoli P. and Kajfez, F. (1981). Use of the centrifugal separation based on *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. Bioeng., 23, 1079-1086.

ثالثا: الانتاج المحلى للباسيلليس ثورينجنسيز فى مصر: المميزات والتحديات.

بالرغم من ان المنتجات التجارية والمستحضرات المبنية على الباسيلليس ثورينجنسيز كوسيلة مكافحة حيوية متوفرة حاليا فى الاسواق الا انها باهظة التكاليف كى تستخدم فى معظم الدول النامية. التكلفة العالية لوسائل المكافحة الحيوية ترجع اساسا الى ان الانتاج يتركز فى الدول المتقدمة مثل اوربا وشمال امريكا حيث تكاليف الانتاج عالية وكذلك ارتفاع تكاليف النقل الى اماكن التشغيل والعمليات. لذلك فان انتاج هذة البكتريا فى مستحضرات مناسبة فى الدول التى تعانى من الافات المتوطنة لابد وان يقلل تكاليف عمليات المكافحة. كذلك يساعد هذا الاتجاه فى تطوير صناعات التخمر المحلية فى الدول النامية. فى مصر وبسبب ان بحوث بكتريا .B.t تجرى ومازالت مستمرة منذ اكثر من ١٤ عام وحيث اصبحت العديد من الافات الحشرية التى تصيب المحاصيل الحقلية والزيتية والخضراوات متوطنة، لذلك اصبح من الضرورى اتخاذ القرارات للبدأ فى عمل وحدات او مصانع او خطوط لانتاج مستحضرات Bt بناء على المواد الفعالة المتوفرة محليا وبمساعدة الشركات الصناعية المحلية. لتحقيق هذا الهدف اجريت دراسة لحصر افضل الاماكن لعمل مصنع على مستوى جيد. فى هذا الموقع يفترض ان يكون هناك امكانيات تسمح بتنفيذ دراسات التخمر الاولية على نطاق مناسب. اظهرت نتائج الحصر ان افضل مكان لهذا الهدف هو شركة السكر والتقطير المصرية فى الحوامدية احدى مدى محافظة الجيزة والتى تبعد ٢٠ كم جنوب المركز القومى للبحوث فى مصر.

العوامل التالية كانت وراء قرار ملائمة شركة السكر والتقطير المصرية كانسب موقع لعمل خط انتاج على مستوى معقول لمستحضرات بكتريا الباسيلليس .B.t.

١- الموقع قريب من المركز القومى للبحوث مما يسهل من الاتصال المباشر والمعايشة والاشراف المباشر على عمليات التخمر.

٢- الشركة تملك وحدات كبيرة متحركة من المخمرات (حتى ٥م^{٣}) مجهزة بكل المستلزمات الضرورية المطلوبة لعمل التخمر وكذلك اجهزة الطرد المركزى وجمع وتجفيف المنتج. الوحدة مصممة فى الاساس لانتاج الخميرة وتتكون من طرز اولى لخط التخمر بحيث يمكن ضبطها وتحويرها حتى تقابل اغراض انتاج بكتريا باسيلليس.

٣- شركة السكر والتقطير المصرية معروف عنها انتاج الخميرة والمولاس التى تستخدم كنواتج ثانوية رخيصة فى عمل بيئة التخمر.

وصف مختصر لمكونات وحدة التخمر المتحركة في شركة السكر والتقطير بالحوامدية

١ــ **مخمـــرديدار ببدال العجلات:** الطول ١٢,٥ م ، العرض ١,٤ م ، الارتفاع ٢,١٢ م ، الحجـم الكلـي ٥٤٠٠ لتر ، الحجم المتفاد منه ١٠٠٠ لتر ، الضغط الجوى العادى ، انقـلاب يدار بالعجلات والبدال ، السرعة ٢٩,٥ لفة في الدقيقة ، دفع القلاب بموتور ١١ KW.

٢ــ **مغـذى الماء البارد:** وحدة تبريد الماء بالهواء البارد وحدة متحركة مصممة خصيصا للاســتخدام خــارج المــبانى. تعمل الوحدة على التخلص من الحرارة المنفردة خلال عمليات التخمر. يستخدم الماء كمبرد كفاءة التبريد تصل الى 120.000 k.s./hr على درجة حرارة ١٤°م مع فتحة دخول الماء وحرارة ٨°م عند مخرج الماء يتكون الوحدة من اربعة مكونات رئيسية هى المضخة والمكثف والمبخر وصندوق التحكم.

٣ــ **وحـــدة ضـــخ الهواء:** تعمل الوحدة على خلق هواء مضغوط خالى من الزيت للتحكم الذاتـــى فـــى درجـــة حرارة المخمر ومجفف الهواء المسال. الوحدة مركبة فى خارج المبنى تتكون من مضخة دون تشحيم ، مجفف على درجة حرارة منخفضة ، مستودع هواء مضغوط ، صندوق التشغيل.

٤ــ **مـــروحة ذات قـــناه افقية:** تكلفة هواء مضغوط خالى من الزيت لتهوية المخمر. يتم سحب الهواء من خلال مرشح دقيق يفصل الشوائب ذات الحجم الاكبر من ٥ ميكرون عن طريق مرشح معقم بعد المبرد يدفع فى وحدة التخمر.

٥ــ **وحـــدة طرد مركزى للتخلص من المواد الصلبة:** تبلغ سرعة البرميل ٣٣٩٠ لفة فى الدقيقة.

٦ــ **وحـــدة عمـــل المجبات من السوائل والاساس:** وحدة تجيب السائل تعمل على تجفيف وتجيـــب عجيـــنة الخميرة (يمكن اجراء محاولات مع بكتريا .B.t). مع تركيز المواد الصلبة ٢٠-٢٥%. يمكن تشغيل الوحدة بصورة مستمرة او على مستوى التحضيرة.

٧ــ **سخان مستمر الانسياب:** يعمل على تزويد المخمر بالماء الدافئ على ٤٠-٥٥°م.

٨ــ **خـــزانات متصـــلة بوحـــدة التخمر المتحركة:** تشمل ستة خزانات معايرة ذات احجام مختلفة داخل وحدة التخمر المتحركة وهى خزان الا ذابة للبيئة المغذية (١٠٠٠ لتر) ، خـــزان استقبال المادة الوسيطة (١٠٠ لتر)، خزان استقبال الحمض (٥٠ لتر) ، والماء قـــياس المادة الوسيطة (٥ لتر) ، خزان الناتج (٤٠٠ لتر) ، خزان التحلل الحرارى (١٠٠ لتر).

٩- **مضخات فى وحدة التخمر المتحركة:** (ستة مضخات) واحدة للبيئة المغذية وواحدة للمولاس واخرى لتدوير الماء البارد وثلاثة للتخمير (المنتج) او يعلق عليها مضخات المعلقة وهى ذات معدلات تعريف مختلفة.

١٠- **اجهزة القياس ووسائل التحكم:** وهى تشمل وحدة للتحكم فى الحرارة ، ودليل الحرارة وجهاز قياس الحموضة ووحدة قياس ثانى اكسيد الكربون.

١١- **مصدر الطاقة لوحدة التخمر المتحركة:** الوحدة مزودة بموتور كهربى مع وحدة ديزل.

(*) سوف اكتفى بهذا العرض مع محاولة الحصول على الوضع الراهن لانتاج Bt فى مصر فى معهد بحوث وقاية النباتات ومعهد بحوث الهندسة الوراثية....

الانتاج الدليلى الاولى لبكتريا Bt باستخدام وحدة التخمر المتحركة:

لقد تم تطوير اقترابات جديدة للحصول على بيئة عملية واقعية لانتاج الدلتا اندوتوكسين بواسطة سلالات Bt (سلامة واخرون ١٩٨٢ ، ١٩٨٣ أ ، ب). فى هذة الاقترابات تم استخدام مواد رخيصة بما فيها النواتج الزراعية الصناعية والخميرة. لقد اجريت سلاسل من تجارب التخمر لانتاج .B.t اندو-توكسين على امتداد ثمانية اشهر باستخدام وحدة التخمر المتحركة المذكورة اعلاه. لقد سبق تجارب الانتاج بعض التجديدات الهندسية للوحدة المتحركة بحيث تتوائم وتتوافق مع غرض التخمر لانها مصممة فى الاساس لانتاج الخميرة. هذة التحويرات شملت زيادة كفاءة الطرد المركزى لوحدة طرد المواد الصلبة وكذلك احداث تغيير كبير فى تصميم المجفف ووظيفتة بحيث يصبح قادرا على تجفيف سائل الرش لتحضير اندوتوكسين البكتريا Bt على درجات حرارة مناسبة.

أ- انتاج Bt من الصنف جاليرى HD-234 على بيئة خميرة مغذية تقليدية:

من الدراسات الاولية تم اختبار سلالة Bt جاليرى تسمى HD-234 كاحدى السلالات الفعالة ضد الحشرات المستهدفة فى برنامج البحوث الخاص بالمركز القومى للبحوث وهى دودة ورق القطن والدودة القارضة. لقد استخدم مصدر عدوى مناسب (١,٥ %) لحقن وعدوى ٥٠٠-١٥٠٠ لتر من البيئة المغذية للخميرة الروتينية ذات المكونات التالية (جم/لتر): خميرة مغذية جافة (٢٠جم) ، مستخلص خميرة (٢جم) ، جلوكوز (٢جم) ، بيتون (٢جم) ، فوسفات بوتاسيوم احادى الايدروجين (٤,٣جم) ، كبريتات ماغنسيوم مائية (٠,٤جم). لقد كانت الحموضة ثابتة حتى نهاية التخمر بالنظر الى كثافة المزرعة وقد لوحظ انخفاض طفيف خلال الخمسة عشر ساعة اولى متبوعا بزيادة قليلة حتى نهاية عملية التخمر بسبب السرعة القليلة لوحدة الطرد المركزى كانت انتاجية الاندوتوكسين

الجـــاف قلـــيلة مع هذا اظهر تقييم فعالية الاندوتوكسين ضد يرقات العمر الثانى من دودة ورق القطن كفاءة عالية حيث اعطى ٩٢% موت.

تاثير اذابة الجلوكوز ومستخلص الخميرة على عملية التخمر

لقد تم تحوير بيئة الخميرة المغذية بما يحقق تخفيض التكاليف للمنتج المحلى. لذلك فـــان كـــلا مســـتخلص الخميرة والجلوكوز استبعدت من تركيب بيئة التخمر وكانت البيئة تـــتكون من (جم/لتر): خميرة مغذية جافة (٥٠جم) ، فوسفات بوتاسيوم احادى الايدروجين (٢جم) ، كبريتات الماغنسيوم (٠,١جم). لقد زاد حجم التخمر الكلى فى هذة القطفة الى١م٣ فـــى مخمـــر بـــدال العجـــلات. بعـــد التبريد ثم ضبط درجة حموضة البيئة الى ٧,٥ مع ايدروكسيد الصوديوم عندما تبرد على ٥٠°م. مستوى التهوية وحجم العدوى كان هو نفسة فـــى التحضـــيرات الســـابقة. قيم الحموضة وكثافة المزرعة تم استكشافها على فترات وقد دونـــت النـــتائج فى جدول (٦-٩). لقد انخفضت درجة حموضة المزرعة الى (٧) خلال ثمانية ساعات من التخمر. بعد ذلك بدأت فى الارتفاع التدريجى حتى وصلت الى (٨) بعد يومـــان. بعـــد ذلك استمرت الحموضة فى الارتفاع حتى وصلت (٩) واصبحت ثابتة فى الاتجاه القلوى حتى نهاية فترة التخمر.

جـــدول (٦-٨): التغـــيرات فى حموضة وكفاءة المزرعة مع الوقت خلال عملية التخمر (قطفـــة -١) لبكتريا Bt جاليرى HD-234 فى وحدة التخمر المتحركة.

معدل التهوية ٨٥م٣ /ساعة.

الحجم الكلى للمزرعة ٢٥٠ لتر. بيئة النمو كانت بيئة الخميرة المغذية الروتينية

التخمر (ساعة)	كثافة المزرعة	درجة الحموضة PH	درجة الحرارة °م	التخمر (ساعة)	كثافة المزرعة	درجة الحموضة PH	التخمر (ساعة)
صفر	١,١١	٧,٢	٢٩	٢٢	١,٠١	٧,٤	٢٨
٤	١,١٢	٧,٢	٢٨	٢٧	١,١٠	٧,٥	٢٨
٥	١,١٣	٧,١	٢٨	٢٨	١,١٠	٧,٦	٢٧
٧	١,١٣	٧,٠	٢٨	٢٩	١,٠٩	٧,٧	٢٦
٨	١,١٣	٦,٨	٢٨	٣١	١,٠٩	٧,٨	٢٥
٩	١,١٣	٦,٦	٢٩	٤٨	١,١٠	٧,٨	٢٧
١٠	١,١٢	٦,٣	٢٩	٦٠	١,١٠	٧,٨	٣٠
١١	١,٠٥	٦,٠	٢٨	٦٤	١,١١	٧,٨	٣٠
١٢	١,٠٧	٦,٠	٢٨	٧٢	١,١١	٧,٨	٣٠
١٣	١,٠٧	٦,٠	٢٨	٧٩	١,١٢	٧,٨	٢٨
١٤	١,٠٨	٦,٢	٢٩	٨٤	١,١٣	٧,٨	٢٩
١٥	١,٠٨	٦,٤	٣٠	٨٥	١,١٣	٧,٨	٢٨
١٦	١,١٠	٧,٠	٢٨	٨٨	١,١٣	٧,٨	٢٧
١٧	١,١٠	٧,٢	٢٨	٩٠	١,١٣	٧,٨	٢٨
٢٠	١,٠٩	٧,٢	٢٨				

جـــدول (٦-٩): تاثير استبعاد مصدر الكربون الحر على حموضة المزرعة والكثافة فى تحوير FMI لبيئة الخميرة المغذية (تحضيرة رقم ٥٠). استخدم بكتريا Bt جالـــيرى HD-234. الحموضة الابتدائية ضبطت على ٧,٤. الحجم الكلى للمزرعة كان ١م^٣.

التخمر (ساعة)	كثافة المزرعة	الحموضة	درجة الحرارة °م	التخمر (ساعة)	كثافة المزرعة	الحموضة	درجة الحرارة °م
صفر	١,١٠	٧,٤	٣٢	٥٠	١,١٨	٨,٠	٣١
٢	١,١٦	٧,٢	٣١	٥١	١,١٨	٨,٢	٣٢
٣	١,١٦	٧,٠	٣٠	٥٢	١,١٨	٨,٤	٣٢
٧	١,٢٦	٦,٩	٣٠	٥٣	١,١٨	٨,٨	٣٠
٨	١,٢٦	٧,٠	٣١	٥٤	١,١٨	٤,٠	٣٠
٩	١,٢٦	٧,١	٣٢	٥٥	١,١٨	٩,٢	٣٢
١١	١,٢٦	٧,٣	٣٢	٦٣	١,١٨	٩,٠	٣٢
١٢	١,٢٦	٧,٤	٣٢	٦٦	١,١٨	٨,٨	٣٢
١٣	١,٢٦	٧,٦	٣٠				
٢٠	١,٢٤	٧,٨	٣٠				
٣٢	١,٢٠	٧,٨	٣٢				

هـــذة البيئة المخمورة (FMI) اعطت انتاجية عالية نسبيا من الاندوتوكسين وصلت لاكـــثر مـــن ٢٠كجـــم/م^٣. هـــذا بالرغم من ان الفاعلية انخفضت بشكل معنوى بالمقارنة بالتحضـــيرات الســـابقة. هذا قد يرجع الى توقف النمو فى مرحلة مبكرة من التخمر بسبب الارتفاع السريع فى درجة حموضة المزرعة.

ادخال وملائمة تركيزات المولاس والخميرة فى بيئة التخمر

امكانـــية استخدام المولاس كمصدر اساسى للكربون اللازم لبكتريا B.t. درست مع التركيزات المختلفة. فى تجارب اخرى اختلف تركيز الخميرة الجافة لاستيضاح المستويات المناســبة لكـــلا المكونـــات. الهدف الرئيسى كان الوصول الى تركيب بيئة مناسبة تصلح للانـــتاج المناسب لمستحضر الاندوتوكسين الفعالة وبكميات مناسبة. اظهرت نتائج تجارب التحضيرة هذة ان التركيزات التالية لمختلف المكونات فى البيئة كانت اكثر ملائمة للانتاج الروتيـــنى للاندوتوكسين الناتج من تخمر بكتريا Bt: الخميرة المغذية الجافة (٤٠جم/لتر)، المـــولاس ٥٥% سكر (١٥جم/لتر) ، فوسفات البوتاسيوم احادى الايدروجين (١جم/لتر)، كبريتات الماغنسيوم المائى (٢جم/لتر). لقد تكررت هذه النسب واعطت نتائج جيدة وثابتة.

لقد تم تسجيل التغيرات التى حدثت فى درجة حموضة وكثافة المزرعة خلال عملية التخمر باستخدام البيئة هذة مع Bt جاليرى HD-234 و Bt كورستاكى HD-341. اظهرت البيانات سلوك متطابق لسلالات Bt فى هذة البيئة حيث انخفاض فى قيم الحموضة فى المراحل المبكرة من النمو. هذا قد يرجع الى تكوين كمية من حامض الخليك من السكر الموجود فى المولاس. لقد استتبع استهلاك السكر من البيئة بناء وزيادة تراكم حامض الخليك وتكوين منتجات قاعدية تؤدى الى تغير ثانى في درجة حموضة بيئة النمو فى اتجاه القلوية. مع استمرار الحموضة فى الارتفاع يحدث تجرثم وتكوين بللورات بالتوافق متبوعا بتحلل الاسبورينجيوم وتحرير الجراثيم والاندوتوكسين مع نهاية فترة التخمر. من المثير والجدير بالاهتمام ملاحظة ان كلا السلالات المختبرة اعطت نفس الاستجابة والسلوك موضحة ان هذا السلوك عبارة عن صفة وراثية فى انواع الباسيلليس B.t.

الجدول (٦-١٠) يوضح كفاءة مستحضرات الاندوتوكسين المتحصل عليها من بكتريا Bt جاليرى HD-234 باستخدام بيئة FM4 فى وحدة التخمير المتحركة. لقد تمت مقارنة النتائج مع المستحضر التجارى المعروف ديبيل 2x ضد يرقات العمر الثانى لدودة ورق القطن. اتضح كفاءة المستحضر المحلى لبكتريا B.t. مقارنة بالديبيل 2x بالرغم من محدودية استخدام وحدة التخمر المتحركة ذات السعة المحدودة التحكم فى ظروف عملية التخمر.

جدول (٦-١٠): تاثير تركيز بعض تجهيزات الاندوتوكسينات ضد يرقات دودة ورق القطن

تحضير اندوتوكسين (رقم التحضير)	[illegible]	نسبة موت اليرقات % عند التركيزات ميكروجرام/ملليلتر		
		٥٠٠	٢٥٠	١٢٥
ديبيل 2x-(مقارنة)	–	٦٧	–	–
١٦	٤,٥	٧٨	٥٣	١٦
١٦	٧,٠	٣٣	٣٣	١٣
١٧	٧,٠	٦٨	٣٠	٣٢
١٨	٧,٠	٤٨	١٦	صفر
١٩	٤,٥	٥٥	٦٥	٣٠
١٩	٧,٠	٥٨	٤٠	١٠
٢٠	٧,٠	٦٣	٦٧	٣٧
٢١	٧,٠	٦٠	٦٠	٣٦

تجهيز اندوتوكسين بكتريا Bt المحلى:

يعتمد الفعل البيولوجى لبكتريا Bt على صفتان على نفس القدر من الاهمية هما كفاءة الاندو توكسين والمواد المضافة لزيادة الفاعلية والمقدرة والثبات. العامل الاخير والمحدود هو تجهيز مستحضر Bt. فى عمليةالمستحضر يؤخذ فى الاعتبار مواصفات اندوتوكسين Bt وظروف التطبيق. على سبيل المثال فانة تاكد من الدراسات الواسعة ان اندوتوكسين بكتريا Bt شديدة الحساسية للاشعة فوق البنفسجية ولذلك فان اضافة واقيات من هذة الاشعة تعتبر من المكونات الهامة والمحدودة لكفاءة المستحضر. بالنسبة للمواد الخاملة والحاملة فان الخليط المحلى من المعادن ذات حجم الجسيمات الاقل من ٤٤ قد تكون مفيدة ومحل اختيار. فى بعض المستحضرات يضاف المولاس ضمن مكونات المساحيق القابلة للبلل. هذا ولو ان اضافة هذا المكون ينصح بان يكون فى الخزان وتحت التجهيز لمحلول الرش اى وقت التطبيق tank-mix

المواصفات المطلوبة لمستحضر بكتريا .B.t: فى سلسلة من الدراسات ثم تجهيز مسحوق من Bt قابل للانتشار فى الماء اخذين العوامل التالية فى الاعتبار:

١. الانسيابية ، القابيلة لبلل ، التفرق والتعلق بما يحقق توفير معلقات ثابتة تحقق توزيع جيد ومتوازن ومتجانس على النباتات المعاملة.
٢. اضافة المواد الوافية من الاشعة فوق البنفسجية UV-Protectant.
٣. يجب ان تكون المواد الاضافية والحاملة خالية من الرطوبة.
٤. ايطال فاعلية المواقع الحامضية النشطة على المادة الحاملة حتى حموضة pka اعلى من ٣,٣ للتاكد من الثبات عند التخزين.
٥. حيث ان الرغاوى غير مطلوبة فان المواد الاضافية تشمل مواد مضادة للرغاوى.

لقد نشر مكونات المواد الفعالة الاساسية كنسب مئوية للمسحوق القابل للانتشار فى المادة المختبر محليا لمستحضر بكتريا Bt .Bt (٧٥% لمستحضر مسحوق (WD)، مادة مبللة (٣%)، ناشرات (٢%)، واقى للاشعة فوق البنفسجية UV (٢%)، زيت (٠,٢٥%)، مثبطات النشاط (٠,٢٥%)، مانعات تكوين الرغاوى (٠,٥٠%)، مادة حاملة ٣٠٠ ش (١٧%).

الجدول (٦-١١): توضح نشاط بعض المستحضرات المجهزة محليا من Bt المنتجة فــى وحدة التخمر المتحركة. تمت مقارنة النتائج مع فعالية –2x Dipel. اظهرت البيانات ان المستحضر (D) هو الافضل تحت الظروف السائدة.

جــدول (٦-١١): تقديــر فعالية مختلف تجهيزات الاندوتوكسين المحضر محليا فى Bt كورستاكى HD-341 ضد العمر اليرقى الثانى من دودة ورق القطن.

مستحضر بكتريا Btالمستخدمة بمعدل ٥٠٠ ميكروجرام/ملليلتر	النسبة المئوية للموت بعد سبعة أيام
Dipel 2X (control)	67
B.t. endotoxin (As such)	63
Local formulation (A)	30
Local formulation (B)	50
Local formulation (C)	25
Local formulation (D)	70

جــدول (٦-١٢): اوضــحت قيم التركيز النصف القاتل Lc_{50} ضد يرقات العمر الثانى. لــدودة ورق القطــن بعــض المستحضـــرات التجارية Dipel 2x. اوضحت النتائج ان المستحضـــرات المحلية كانت على الاقل على مستوى فاعلية الديبيل X٢ التجارى مرتفع الــتكلفة. فـــى الدراســات المســتقبلية على المستحضرات سوف تجرى بحوث وتجارب لاستيضاح فترة حياه المستحضرات للتاكد من ثباتة لمدة ١٢ شهر على الاقل تحت ظروف التخزين المعتدلة.

جــدول (٦-١٢): تقدير Lc_{50} لبعض مستحضرات اندوتوكسين الناتجة من وحدة التخمر المــتحركة قبل وبعد تجهيز المستحضر ضد العمر الثانى ليرقات دودة ورق القطن.

المركب المستخدم	B.t.	ظروف التجهيز	Lc_{50} ميكروجرام/ملليلتر
Dipel 2x (مقارنة)	–	كما هو	٦٨٦
الانتاج المحلى تحضير (١٧)	كورستاكى HD341	كما هو	٣٤٠
الانتاج المحلى تحضير (١٧)	كورستاكى HD341	بعد التحضير والتجهيز	٦٣٠
الانتاج: تحضير مخلوط من اربعة تحضيرا	جاليرى HD234 جاليرى HD234	كماهو بعد التحضير والتجهيز	٥٨٠ ٥٦٣

REFERENCES

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and El-Sharaby, A. (1982). A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. Entomophaga 28, 151-160.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and El-Sharaby, A. (1983a). Utilization of fodder yeast and agro-industrial by production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringinsis*.Zbl. Mikrobiol. 38, 553-563.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Dulmage, H. and El-Sharaby, A. (1983b). Novel fermentation media for production of delta-endotoxins from *Bacillus thuringinsis*. J. Invertebr. Pathol. 41, 8-19.

رابعـــا: اســـتخدامات تجهيزات الباسيلليس ثورينجنسيز ضد الفراشة ذات الظهر الماسى "بلوتيلا زيلوستيلا " فى تايوان

المساحة الكلية الجارية المزروعة بالخضراوات وصلت ٢٠٠ الف هكتار فى تايوان وهى جزيرة تبلغ مساحتها الكلية ٣٦ الف كيلومتر مربع. العديد من انواع الافات الحشرية تحـــدث علــى مدار العام بسبب موقعها المتميز فى المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية. الفراشـــة ذات الظهر الماسى (DBM) بلوتيلا زيلوستيلا (الى) تعتبر من اكثر الافات التى تهـــاجم النـــباتات الصليبية وقد تاكد ان لها ٢٠ جيل فى السنة (Toa and Lee ١٩٨١). مقاومـــة حشـــرة DBM لمجامـــيع المبيدات الحشرية المختلفة كانت متباينة ولكنها كانت خطيرة فى تايوان وغيرها فى الدول الاسيوية كما ذكر بواسطة شيبج (١٩٨٨). لذلك فان وسائل المكافحة البديلة تعتبر ذات اهمية ومطلوبة للمجابهة الفعالة لافات النباتات الصليبية. البكـــتريا القاتلـــة للحشـــرات باســـيلليس ثورينجنسيز (B.t.) قدمت فى تايوان منذ ١٩٥٨ والمركـــبات المحـــتوية على B.t. سجلت لاول مرة لمكافحة الحشرات عام ١٩٦٧ (Ho4 ١٩٨٩). اظهـــر الاســـتطلاع الميدانى عن اوليات او اولويات استخدام المبيدات الحشرية بواسطة الفلاحين المحليين ان منتجات Bt تحتل المرتبة السادسة من بين ١٨ نوع مختلف مـــن المبيدات التى شملها الحصر (اما ١٩٨٤). فى الوقت الحالى تستخدم منتجات Bt فى الغالـــب فـــى مكافحـــة الحشـــرات التى تصيب الخضراوات فى تايوان وهذا يوضح انها عريضة القبول لدى مزارعى الخضراوات للتطبيق الحقلى. لسوء الحظ فان المعلومات عن المـــراحل المختلفة من تطبيقات مستحضرات B.t. هزيلة بالرغم من ان المواد الميكروبية دخلت فى هذة الجزيرة منذ اكثر من ٣٠ سنة. فى هذا المقام سوف تتناول مردور البحوث عن استخدام مستحضرات Bt لمكافحة حشرة الفراشة ذات الظهر الماسى على خضراوات العائلة الصليبية.

مواد وطرق الدراسة:

تـــم جمع سلالات مختلفة من الحشرة P. Xylostella من ستة مناطق موزعة على اجـــزاء مخـــتلفة مـــن تايوان. تم تربية الحشرة على اوراق الكرنب فى حجرات نمو على درجـــة ٢٥°م. اســـتخدام العمـــر الـــيرقى الثالث للتقييم الحيوى بانواعة. تم اختيار ثلاثة مستحضرات من بكتريا Bt للاختبارات وهى الباكتوسبين (فرنسا-بيوكيم) والديبيل (ابوت) والثوروســـيد (ســـاندوز) وجميعها كانت فى صورة مساحيق قابلة للبلل WP مع ١٦٠٠٠

وحـــدة دولـــية/مللجـــم. اجريت اختبارات معملية لتقدير حساسية حشرة DBM للسلالات المخـــتلفة من Bt وكذلك تم دراسة المرضية وحيوية جراثيم Bt ومدى تاثيرها بالحموضة لمـــاء التخفيف ودرجة حرارة التحضين. تم اجراء التقييم الحيوى للبكتريا مع اضافة مادة Sinigrin والكانـــيونات كذلـــك درس تاثـــير الجرعات تحت القاتلة من بكتريا B.t. على حشرة DBM. علاوة على ذلك اجريت اختبارات حقلية على مستحضرات بكتريا Bt ضد الحشـــرة حيـــث اجريـــت التجارب فى موسم الشتاء (نوفمبر-يناير) وتم تخفيف المنتجات بالماء ١٠٠٠ مرة كما تم اضافة بعض المواد الاضافية. اجريت الرشة الاولى عند مستوى ٣-٤ اوراق لكل نبات وبعد ذلك اجريت اربعة رشات على فترات اسبوعية بين كل منها. اســـتخدمت مبيدات البيرمثرين والكارتاب للمقارنة. تم حصر عدد اليرقات على ٢٠ نبات فـــى كـــل قطعة تجريبية قبل الرش بيوم واحد وبعد ٣ ايام من الرش. تم قياس المساحات التالفة من الاوراق لتقييم الفاعلية وكفاءة المكافحة.

النتائج التى اسفرت عنها الدراسة:

١- مرضية Bt للسلالات المختلفة من حشرة DBM:

تظهـــر النـــتائج فـــى جدول (٦-١٣) ان سلالات الحشرة التى جمعت من الاماكن المخـــتلفة مـــن تايوان كانت جميعها حساسة له مستحضرات Bt المختبرة حيث لم تتعدى الاخـــتلافات فـــى معايير الموت Lc_{50} ، Lc_{75} اكثر من ٣ مرات بين السلالات . السبب اســـتخدام Bt فى مكافحة الحشرات على الخضراوات لاكثر من حقبتان زمنيتان فى تايوان لـــم تظهـــر الدراسة اختلافات ملحوظة فى مرضية البكتريا للحشرة مما يدل على ان هذة البكتريا مازالت تعمل بنجاح فى مكافحة الحشرة فى تايوان.

جدول (٦-١٣): مقارنة بين مرضية باسيلليس ثورينجنسيز على مختلف سلالات بلوتيلا زيلوستيلا المجموعة من مختلف اماكن تايوان

Strain[1] السلالة	B.t. conc. (IU/ml)						
	LC_{50}	Ratio	LC_{75}	Ratio	LC_{90}	Ratio	Slope
BC	98.2	1.0	437.3	1.0	3.757.4	1.0	1.04
CH	132.9	1.4	730.6	1.7	8.507.8	2.3	0.91
LC	134.3	1.4	1.040.9	2.4	9.881.7	2.6	0.76
TC	196.3	2.0	811.8	1.9	6.274.4	1.7	1.09
TL	91.0	0.9	609.9	1.4	9.446.4	2.5	0.82
TT	284.3	2.9	1.309.2	3.0	11.812.0	3.1	0.62

1) BC (Ban-chiao), CH (Chang-hua). LC (Lu-chu), TC (Tou-cheng), TL (Ta-li), TT (Tai-tung)

٢- العوامل المؤثرة على كفاءه مستحضرات Bt ضد حشرة DBM:

٢-١- حموضة ماء التخفيف:

فى التطبيق العملى لا يلقى الفلاحون بالحموضة ماء التخفيف الموجودة بالقرب من حقول الخضراوات. لذلك كان من الاهمية بمكان استيضاح هذا التاثير.

الجــدول (٦-١٤): يوضــح حدوث نسب متقاربة من موت اليرقات على درجات حموضة تتراوح من ٢ وحتى ١٠ وقد لوحظ اختفاء حيوية الخلايا تماما مع حموضة (٢). لذلك لا خوف على الفلاحين من هذا العامل عند استخدام مستحضرات Bt فى الحقل.

جدول (٦-١٤): تاثير الحموضة على عنف وحيوية جراثيم Bt على حشرة DBM

	الموت %	حيوية الخلايا (مستعمرات/مللي)
PH	Mortality (%)	Viable cells (colonies/ml)
2	95.7 ± 4	0.000
4	95.8 ± 6	3.030
6	100.0 ± 0	1.346
7	97.6 ± 3	1.710
8	100.0 ± 0	2.083
9	100.0 ± 0	1.277
10	97.7 ± 0	3.780

٢-٢- تاثير درجات الحرارة على حيوية جراثيم .B.t: اظهر التقييم الحيوى لحيوية .B.t علـــى بيـــئة المزرعة نتائج متفاوتة بالرغم من ان Bt استمرت فى النمو على درجات الحـــرارة المـــرتفعة عندما تخلط بالمواد الاضافية (جدول ٦-١٥). امكن الكشف عن مســتعمرات Bt على درجة حرارة ٢٠°م وحتى ٣٥°م بعد الاستخدام لمدة ١٤ دقيقة. لقد اقترح ان الحرارة لم تضر بشكل خطير بحيوية الجراثيم بعد الرش على النباتات.

جدول (٦-١٥): ثبات بكتريا Bt على درجات الحرارة المختلفة

Treatment	No. Colonies/mm^2						
	Temp. (°C)	Day intervals after application					
		0	1	2	4	7	14
B.t. only		223.2					
	20		55.7	152.8	4.6	0.0	4.5
	25		77.8	23.1	0.3	4.4	3.7
	30		156.2	6.1	4.7	4.7	1.7
	35		2.9	14.7	0.0	1.5	2.8
B.t. + Sandovit		78.2					
	20		13.9	127.3	0.0	0.7	4.4
	25		36.8	126.8	0.0	3.7	0.1
	30		2.1	5.1	2.8	0.4	0.2
	35		9.4	216.3	0.0	15.1	0.3
B.t. + Agral 90		60.5					
	20		15.9	121.0	0.0	5.1	1.2
	25		13.6	8.1	1.6	6.0	1.6
	30		10.9	0.6	2.6	0.6	1.5
	35		9.8	11.8	0.0	2.3	2.2

٢-٣- تاثير Sinigrin على كفاءة بكتريا .B.t ضد حشرة DBM:

لقــد تحققــت زيــادة فــى فعالــية بكتريا .B.t ضد حشرة DBM عندما اضيف الســينيجرين لتركيزات واطية من بكتريا الباسيلليس Bt مثل ٣,٢ وحدة دولية/ملليلتر كما لوحظــت زيادة فى موت اليرقات مع ١٦ ، ٣٢ وحدة دولية/ملليلتر. التاثير الافضل لمادة Sinigrin تحصــل علــيها من ٠,٠١ جزء فى المليون فى ١٦٠ وحدة دولية/ملليلتر. لقد كانــت الجــرعة المناســبة مــن الســينيجرين ٠,٠١ جزء فى المليون مع التقييم الحيوى لتركيزات مختلفة من Bt (جدول ٦-١٦).

جدول (٦-١٦): تاثير مضاف Sinigrin على عنفوانية بكتريا Bt على حشرة DBM

تركيز البكتريا	جزء فى المليون				موت اليرقات (%)
B.t. conc.					تركيز سينجرين
(IU/ml)	0	0.001	0.01	0.1	1.0
3.2	12.5	23.5	44.8	50.8	79.6
16.0	21.1	44.0	54.3	52.8	51.8
32.0	48.2	63.3	72.0	54.2	66.7
160.0	60.0	72.0	82.9	77.0	78.4

٢-٤- زيادة مرضية بكتريا Bt بواسطة الكاتيونات:

الجدول (٦-١٧) يوضح ان اضافة املاح مختلفة لتجهيزات البكتريا Bt قد تزيد من المرضـية علـى حشرة DBM خاصة كلوريد الكالسيوم الذى ادى الى زيادة مقدارها ٦ امثال بناء على قيم التركيزات النصفية القاتلة LC_{50}. الاملاح الاخرى قد تحفز وتزيد من مرضـية Bt بدرجـات معيـنة لذلك فان الكاتيونات فعالة فى زيادة كفاءة Bt ضد حشرة DBM.

جدول (٦-١٧): تاثير الكاتيوانت على مرضية Bt لحشرة DBM

	B.t. conc. (IU/ml)			
Salt (0.5%)	LC_{50}	LC_{75}	LC_{95}	Slope
B.t. only	209.3	2.382.8	79.158.0	0.64
$CaCl_2$	33.5	105.4	548.7	1.36
$MgCl_2$	85.6	385.7	3.373.9	1.03
Na_2Co_3	89.1	338.8	2.319.3	1.16
K_2Co_3	175.3	254.4	435.0	4.17

تاثير الجرعات تحت القاتلة من بكتريا .B.t على حشرة DBM:

الجـرعات تحـت القاتلـة من بكتريا الباسيلليس Bt قد تسبب خفض فى نسبة الفقد ووزن العذارى والحشرات الكاملة الناتجة كما تطيل من فترة دوام العذارى لحشرة DBM (جـدول ٦-١٨). فى هذة الدراسات اعتبرت ٣٢ وحدة دولية/ملليلتر او اقل جرعة تحت مميتة وقد وجد ان تعذير وخروج فراشات حشرة DBM كانت حوالى ٦٠% بالمقارنة بما يـزيد عن ٩٠% مع مجموعة المقارنة ولو ان نسبة موت اليرقات كانت ٢٨% فقط. لذلك

فـــان اســـتخدام الجـــرعة تحت القاتلة تكون فعالة فى خفض تطور الحشرة كما تفيد بشكل معنوى فى مكافحة الافات

جدول (٦-١٨): تاثير الجرعة تحت القاتلة على موت اليرقات وتطور حشرة DBM

الجرعة Dose (IU/ml)	عدد اليرقات No. larvae	موت اليرقات % Larval mortality (%)	التعذر % Pupation (%)	وزن العذارى Pupal wt. (mg)	دوام التعذر Pupal duration (days)	خروج الفراشات % Adult emergence (%)
0.0	81	1.10	97.50	5.05	3.68	92.40
3.2	131	16.11	87.50	4.85	3.64	75.98
16.0	122	14.34	83.54	4.64	3.64	73.58
32.0	148	28.05	63.24	4.70	4.70	60.98
160.0	128	61.18	42.82	3.73	4.13	19.73
320.0	119	69.64	39.90	3.64	3.95	9.78

اختبارات حقلية لمستحضرات Bt ضد حشرة DBM على القرنبيط:

الجـــدول (٨-١٩) يوضــــح ان ٣ مستحضرات مختلفة من بكتريا Bt كانت افضل قلـــيلا مـــن الكارتاب ومبيد البيرمثرين على معايير عدد اليرقات على الاوراق خاصة مع اضــــافة الاجرال –٩٠ للمستحضرات. تقييم مساحات اوراق القرنبيط التى تلفت واختبرت بواســـطة حشـــرة DBM اوضـــحت افضـــلية لتجهيزات بكتريا Bt بالمقارنة بالكارتاب والبيرمثريـــن مـــن الواضح ان مستحضرات Bt كانت اكثر فاعلية فى مثل حشرة DBM عما هو الحال مع المبيدات الحشرية الكيميائية تحت الظروف الحقلية فى تايوان.

فـــى الـــنهاية اود الاشــــارة الى الكشف حديثا عن تطور ظاهرة المقاومة فى حشرة DBM ضد مستحضرات بكتريا الباسيلليس Bt فى هاواى(Tabashrik واخرون١٩٩٠). اوضحت الدراسة الحالية استمرار فاعلية Bt فى مكافحة الفراشة ذات الظهر الماسى على النـــباتات الصـــليبية فى تايوان. كذلك اتضح الدور الهام للعوامل الطبيعية مثل الحموضة والحرارة والمواد الاضافية فى تحديد كفاءة مستحضرات بكتريا Bt فى الحقل. لقد ذكر ان

مضـــاف Sinigrin وهــو مستخلص من اوراق النباتات الصليبية وعادة جليكوسيد زيت الخـــردل يعمـــل كمنشط للتغذية لحشرات ابى دقيق الكرنب DBM (Bech ml Reeve ١٩٧٦). وجـــد ان طعـــم المستحضر المحتوى على مستخلصات بذور القطن وهو محفز ومنشط للالتهام قد يزيد من كفاءة Bt ضد دودة ورق القطن (النقراشى واخرون ١٩٨٦).

جـــدول (٦-١٩): اعـــداد يرقات DBM على القرنبيط بعد الرش بمستحضرات مبيدات حشرية مختلفة (شابج هاور ١٩٨٧)

المعاملة	التخفيف ١٠ م	عدد اليرقات No. of larvae[1]				
		تاريخ الرش				
		Nov. 27	Dec. 8	Dec. 19	Dec. 29	Avg[2]
Cartap	1x	44.3[a]	10.8[bc]	54.3[ab]	28.8[bc]	34.5[ab]
Permethrin	2x	25.3[abc]	18.9[ab]	46.0[abc]	42.0[ab]	33.3[abc]
Dipel	1x	21.3[abc]	9.8[bc]	35.8[bcd]	25.8[cd]	23.1[bcd]
Bactospeine	1x	20.0[abc]	6.8[c]	33.5[bcd]	22.8[cd]	20.8[bcd]
Thuricide	1x	12.0[bc]	10.8[bc]	18.0[cd]	19.8[cd]	15.1[cd]
Thuricide + Agral 90	1x & 5x	8.0[c]	6.8[c]	12.5[cd]	12.3[d]	9.9[d]
Thuricide + Agral 90	0.8x & 5x	21.2[abc]	8.8[bc]	22.5[bcd]	20.3[cd]	18.3[bcd]
Thuricide + Agral 90	0.5x & 5x	21.8[abc]	6.8[c]	8.9[d]	12.3[d]	12.4[d]
Check		38.0[ab]	22.0[a]	73.8[a]	59.3[a]	48.3[a]

1. Means followed by the same letter are not significantly different at 5%.

2. No. of larvae per 10 plants.

REFERENCES

Akiba, Y. and Katoh, K. (1986). Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*. V. Selection medium for *Bacillus thuringiensis*. Vegetative cells. Jpn. Appl. Ent. Xool., 21 , 210-215. (In Japanese).

Alford, A.R. and Holmes, J.A. (1986). Sublethal effects of carbaryl, aminocarb, fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis*. On the development and fecundity of the spruce budworm (Lep., Tortricidae). J. Econ. Entomol., 79 , 31-34.

Beck, S.D. and Reeve, J.C. (1976). Insect-plant interaction : nutrition and metabolism. In "Recent Advances in Phytochemistry Biochemical Interaction between Plants and Insects" (J.W. Wallace, ed.). Plenum Press, N.Y. and London. 10, 41-92.

Chang, L.C. (1972). Vegetable insect control by thuricide and other insecticides. Taiwan Agric. Quart., 8 , 164-169. (In Chinese).

Cheng, E.Y. (1988). Problems of control of insecticide-resistant Plutella xylostella. Pestic. Sci., 23, 177-188.

El-Nockrashy, A.S.; Salama, H.S. and Taha, F. (1986). Influence of bait formulations on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis*. Against Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lep., Noctuidae). J. Appl. Entomol., 101, 381-389.

Falcon, L.A. (1971). Use of bacteria for microbial control. In "Microbial Control of Insects and Mites" (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London and N.Y., 67-95.

Hou, R.F. (1989). Control of the diamondback moth, *Plutella xylostella,* using entomopathogens. Chinese J. Entomol., Special Publication No. 4, 46-52. (in Chinese).

Hou, R.F. and Hsiao, M.L. (1986). An improved diet for rearing the diamondback moth, *Plutella xylostella,* and its requirements for fatty acids. Chinese j. Entoml., 6, 31-37.

Ignoffo, C.M. and Gregory, B. (1972). Effects of *Bacillus thuringiensis.* –exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera. Environ. Entomol., 1, 269-272.

Kirsch, K. and Schmutterer, H. (1988). Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis.* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. J. Appl. Ent., 105, 249-255.

Li, G.C. (1984). Residue problems associated with insecticide use on vegetables and their preventions. Proc. Symp. Insect control Veggetables in Taiwan. Dept. of Agricluture and forestry, Taiwan Provincial Government. 116-133. (In Chinese).

Salama, H.S.; Foda, M.S. and Sharaby, A. (1984). Novel biochemical avenues for enhancing *Bacillus thuringiensis.* Endotoxin potency against Spodoptera littoralis (Lep. : Noctuidae). Entomophaga, 29, 171-178.

Tabashnik, B.E. ; Cushing, N.L.; Finson, N. and Johnson, M.W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis.* In diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). J. Econ. Entomol., 83, 1671-1676.

Tao, C.C. and Lee, H.S. (1981). Population fluctuation of cruciferous insect pest and their control in Taiwan. Proc. Symp. Production and Insect control of Cruciferous Vegetable in Taaiwan. (.N. Chen and W.Y. Su, eds.). 16-31. (In Chinese).

خامسا: التحديات والصعوبات التى تجابة استخدام الباسيلليس ثورينجنسيز فى الفلبين.

من مقالة للباحث L.E.Padua بالمعهد القومى للتكنولوجيا الحيوية والميكروبيولوجيا التطبيقية (Biotech) جامعة الفلبين-لوس بانوس-لاجونا- ٤٠٣- الفلبين. لقد قدم الباحث بالقول باهمية بكتريا Bt فى مكافحة الحشرات ذات الاهمية الاقتصادية والطبية. ادت البحوث عن كفاءة وفاعلية هذة البكتريا الى الاسهام فى تطوير وسائل المكافحة الميكروبية ليس فقط حشرات حرشفية الاجنحة (Heimpel ١٩٦٧، دلماج وتوبيراتورز ١٩٨١ ، فاوست وبولار ١٩٨٢) ولكن ضد حشرات ثنائية الاجنحة كذلك (جولدبرج ومارجاليت ١٩٧٧، de Barjac ١٩٧٨، اندين وناجيل ١٩٧٨ وغيرهم) حديثا اعلن عن تحت نوع جديد من Bt ذات سمية عالية ضد حشرات غمدية الاجنحة فى المانيا وامريكا (كريج واخرون ١٩٨٣، هيرمستدات واخرون ١٩٨٦). التوزيع الواسع لهذة البكتريا نشر بواسطة العديد من الباحثين. فى الفلبين اجريت المحاولات الاولى لعزل وتعريف هذة البكتريا عام ١٩٨٢ (بودوا واخرون ١٩٨٢) ولو ان جابرييل (١٩٦٨، ١٩٧٠) اشارا الى ادخال وتتابع استخدام التجهيزات التجارية للباسيلليس تحت النوع ثورينجنسيز من الطرز السيولوجى H.1. اكتشاف عزلات جديدة من Bt ذات قيمة فى ابادة الحشرات وملائمة الاستخدام اعطت اهمية لهذة البكتريا فى المكافحة الحيوية. فى هذا المقام سوف نتناول البحوث التى اجريت وبعض التحديات التى تجابة استخدام بكتريا Bt فى الفلبين. السمية الكمية اختبرت على هذة البكتريا التى تكون جراثيم بللورية حيث الافات الحشرية الهامة محليا التى تصيب الذرة والصليبيات والارز وجوز الهند وبعض الحبوب والمنتجات المخزونة. لقد اجرى تقييم حيوى لالقاء الضوء على فعالية هذة البكتريا ضد بعض الممرضات البكتيرية والفطرية على بعض الحاصلات الزراعية.

Bt ضد الحشرات والامراض ذات الاهمية الاقتصادية:

الذرة والصليبيات والارز وجوز الهند من المحاصيل الرئيسية فى الفلبين كما تعتبر الحشرات والافات والامراض من بين العوامل المؤثرة على الانتاجية المحصولية. مكافحة هذة الافات تعتمد على المبيدات الحشرية الكيميائية ولو ان فعاليتها كانت محدودة بدرجات متفاوتة. من المثير للاهتمام ان مجاميع الحشرات والممرضات النباتية طورت مقاومة لعدد من هذة الكيميائيات بسبب الاستخدام المكثف وغير العقلانى. لقد ادى هذا الوضع الى عدم توازن ايكولوجى خلال تحطم او القضاء على الكائنات غير المستهدفة مثل المفترسات

والطفيليات وكذلك تراكم المخلفات السامة فى البيئة. لقد استدعى هذا الموقف ضرورة تطوير بدائل او طرق اضافية لمكافحة الافات.

تقييم كفاءة Bt ضد ثاقبة الذرة الاوربية:

اظهرت اختبارات التقييم الحيوى لبكتريا Bt ضد ثاقبة الذرة الاوربية Ostrinia Furnacalis الدليل الاول عن الاختلافات الظاهرة فى مستوى سمية العزلات المحلية والمستوردة (بادوا واخرون ١٩٨٧-٩). بناء على العزلات ٢٦٥ المختبرة ضد يرقات العمر الثالث كانت مستحضرات LEP-20، (PG-02 , HD-23 اكثر سمية بتقييم LC50 تساوى ٨٥,٩٢ ، ٩٣,١٧ ، ١٤١,٠١ مللجم/لتر بيئة على التوالى. لقد حدث موت فى اليرقات بعد يومان من المعاملة بمستحضرات LEP-20 و PG-02. لقد وجد ان اليرقات المعدية تستهلك غذاء اقل من المعاملة الخاصة بالمقارنة.

Bt ضد الفراشة ذات الظهر الماسى:

الفراشة ذات الظهر الماسى من الافات الخطيرة لنباتات العائلة الصليبية فى الفلبين. المكافحة تعتمد على استخدام المبيدات الحشرية مما ادى الى ظهور سلالات مقاومة بشكل ملحوظ. مع تخفيف القليل من العزلة فى ١٠٠ ملليلتر ماء مقطر حيث اعطى المستحضرات نسبة موت ٦٠-٨٨% بعد ٢٤ ساعة من المعاملة بعزلات HD-61, HD-54, PG-02. LEP-13, LEP-21 ضد يرقات العمر الثالث (بادوا واخرون ١٩٨٧-٩). العزلة المحلية PG-02 وجدت سامة للبلوستيلا والاوسترينيا بينما عزلة HD-1 كانت اقل سمية.

حساسية بعض افات حرشفية الاجنحة التى تصيب الارز لبكتريا Bt:

لقد اتضح انه من بين ٣٠٠ عزلة من B.t. اعطى اكثر من ٥٠% سمية ضد لافات الاوراق والديدان الخضراء الشعرية ، ثاقبة الساق الصفراء ، ثاقبة الساق المخطط ، دودة الارز المكسية. لقد اختلفت حساسية اليرقات لعزلات Bt وكذلك وجد ان ثاقبات الساق فى الارز مقاومة بالمقارنة بالافات الاخرى التى تصيب الارز. من بين ٢٨٧ عزلة استخدمت فى تجارب التقييم الحيوى ضد ثاقبة الاوراق الخضراء N-aenescens اتضح ان LEP-54، LEP38، LEP-57, LEP-54 كانت الاكثر سمية. لقد كانت سمية العزلات الاربعة

مقارنـــة بالعزلتيـــن اللــــتان اخذتا من المنتج التجارى (I and II) الموجودة فى الاسواق الفلبينـــية. لقــد وجـــد ان سلالتى LE-54 و LEP-54 كانت اكثر سمية من I و II بقيم LC50 ٢,٦ ، ٣,٨ مللجم/لتر على التوالى (جدول ٦-٢٠).

جدول (٦-٢٠): قيم LC50 لعزلات Bt ضد العمراليرقى الثالث لحشرة لافات الاوراق الخضراء اللوز.

العزلة	Lc_{50} (mg/L)*	Fiducial Limit (mg/L)
I	4.7[a]	2.5-8.9
II	7.9[a]	2.7-47.5
LEP-38	16.9[a]	6.5-54.7
LEP-54	3.8[a]	1.5-9.4
LEP-57	7.3[a]	3.9-12.3
LEP-59	2.6[a]	1.3-47

فاعلية Bt ضد افات الحبوب المخزونة:

لقد تم اختبار ١٤٥ عزلة ضد حشرات الحبوب المخزونة ريزوبيرثا دومينيكا، سيتو فيلـــيس زيامـــيز، ترايبولـــيوم كاســـتانيم. لقـــد اعطـــت ٣٠ عزلة ٥٠-٨٠% موت ضد الريزوبـــيرثا. عندما استخدمت هذة العزلات فى اختبار تاكيدى اعطت ٦ عزلات ٥٠-٦٠ % موت. معظم العزلات المختبرة اعطت من صفر-٢٥% موت فقط. لم يثبت وجود اى مـــن العـــزلات المختـــبرة ذات سمية ضد T.Castaneums S.Zeamais . عند فحص الحشـــرات الكاملة الناتجة من البيئة المعاملة بعد شهرين وجدت عزلات احدثت خفض فى مجمـــوع الحشـــرات ٥٠-١٠٠% عـــن المقارنة وكذلك ٥٠-١٠٠% اعلى من المقارنة. خفـــض او زيادة التعداد فى بعض الصفات المعاملة ببعض عزلات البكتريا يجب ان تؤخذ فى الاعتبار تحت مفهوم ما بعد التاثير لبكتريا Bt (after effect) على الحشرات الكاملة للافات المستهدفة.

الكفاءة البيولوجية لبكتريا Bt ضد الممرضات انباتية:-

اجريـــت الاختـــبارات الاولـــية لبكـــتريا Bt ضد الزانثوموناس اوريزيا ، اورينيا كاروتوفورا ، بسيدوموناس سولانا سيريوم ، بيثيوم ديباريانيم ، سكلوروتيوم رولفساى فى المعمـــل. اظهرت النتائج انه من بين ١٣٧ عزلة من Bt المختبرة اظهرت اربعة استجابة

موجبة ضد الممرضات البكتيرية الاربعة بينما اظهرت عشرة عزلات استجابة موجبة ضد الممرض الفطرى P.debaryanum ولم يظهر اى من العزلات كفاءة ضد الاسكليروشيوم. لقد وجد ٢-٣ عزلات. Bt فعالة ضد بعض الممرضات البكتيرية. لقد لوحظ خفض فى الفعل والادار لبكتريا B.t. عندما استخدمت فى مرحلة النمو المسيليوس للفطر.

سمية بكتريا Bt ضد ديدان جوز الهند:

من بين ١٥٠ عزلة اختبرت اعطت العزلات HD-72, AO-97, HD-52, C-27, HD-595 فعل ابادى عالى ضد الحشرات. لقد كان HD-595 و C-27 اكثر سمية مع قيم LC50 تساوى ٢٦,٥٢ ، ٩٧,٤١ مللجم/لتر على التوالى. لقد كانت العزلتان اكثر سمية من الخلايا النقية من المستحضر التجارى. بوجة عام فان الاعراض التى حدثت على الحشرات المصابة كانت فى صورة توقف التغذية وفقد الالوان والشلل فى الحركة والموت والكسل. اليرقات الميتة تصبح بنية سوداء وحتى الاسود ثم تصبح متعفنة وهى نفس الصفات المعروفة للحشرات المعدية بهذة البكتريا.

فاعلية .B.t ضد الحشرات ذات الاهمية الطبية:

المكافحة الحيوية الاولية ليرقات البعوض فى الفلبين اجريت باستخدام انواع السمك مثل الجامبوزيا افينسيك وبويسيليا ريتيكيولاتا. الحاجة لتحسين وسائل المكافحة الحيوية ادت الى تحفيز البحوث نحو الطرق الحديثة. فى اتجاه البحث عن مركبات امنة وفعالة ضد اليرقات وجد ان بكتريا PG-14 لبكتريا Bt موريسونى (الطرز السيرولوجى : H8a 8b) عالية واختيارية السمية ومن ثم طورت. لقد تم عزل PG-14 من عينات التربة من قناه سيبوسيتى فى الفلبين (بادوا واخرين ١٩٨٢). هذة العزلة تنتج اجسام بللورية دائرية او غير منتظمة ذات سمية عالية ضد يرقات البعوض وليس ضد دودة الحرير والدافنيا الناضجة. لقد كانت هذة العزلة اول اكتشاف من المناطق الاستوائية وهى تختلف سيرولوجيا عن Bt تحت النوع اسرائلينسيز H-14.

سمية PG-14:

لقد وجد ان PG-14 ذات سمية عالية للعديد من انواع البعوض فى الفلبين. لقد اتضح ان درجة السمية تساوى ما تحدثة تحت النوع اسرائيلينسيز على بعض انواع يرقات

البعوض. البللورات المنقاه من PG-14 شديدة الشبة فى السمية التى تحدثها السلالة الاسرائيلية كما تاكد من قيم LC50 والتى وصلت الى ٢,٩٧ ، ٣,٣٦ ميكروجرام/ملليلتر على التوالى (Ibarra and Federici ١٩٨٦). التقييم الحيوى لمعقد الجراثيم والبللورات ضد بعوض انوفيليس ايجيبتى والكيوليكس موليسيش اظهر ان PG-14 كانت سامة مثل الاسرائيلية مع قيم LC50 ٠,٠٤٤ ، ٠,٠١٨ ، ٠,٥٢ ، ٠,٠٣٣ مللجم/لتر (باردو واخرون ١٩٨٤). لقد لوحظ من التطبيق الميدانى للمستحضر PG-14 المحلى انه حقق خفض فى التعداد ٩٠% (Padua ١٩٨٨).

التحديات التى تعترض استخدام بكتريا Bt فى مكافحة الافات الحشرية:

لقد اشار جبريل (١٩٦٨ ، ١٩٧٠) ان ادخال واستعمال التجهيزات التجارية لبكتريا B.t. خاصة ضد الفراشة ذات الظهر الماسى وهى من اكثر الافات اهمية التى تصيب الصليبية فى البلد. منذ ذلك التاريخ تقبل الفلاحين استخدام هذة البكتريا ضد هذة الحشرة. لقد كان المنتج التجارى الاول الذى قدم فى الفلبين هو باسيلليس ثورينجنسيز (الطرز السيرولوجى H-1) وبعد ذلك تحت النوع كورستاكى (الطرز السيرولوجى H3 : 3b). لم يكن الاستخدام التجارى على مستوى كبير بسبب التكلفة العالية والتوفر فى الاسواق. تكلفة المنتج غير ثابتة وليس دائما متاحة لانه مستحضر مستورد. وجد كذلك ان الفاعلية متفاوتة. فى الدراسات المعملية اتضح ان اختلاف عدد المستعمرات مما يفسر النباتات فى السمية. هناك عامل اخر يجب ان يؤخذ فى الاعتبار وهو طول فترة شحن المنتج من امريكا وحتى بعد الاستخدام. عندما تتبعنا خطوات وصول المركب المستورد من بلد المنشا وحتى الشركة المحلية وجدناها ستة اسابيع من امريكا حتى يصل الى ميناء الدخول. بعد ذلك يستغرق نقل المركب حتى يصل الى الشركة المحلية شهر او ستة اسابيع اخرى. لذلك فان الوقت الكلى الذى يستغرقه المركب من امريكا وهى بلد معتدلة المناخ حتى يصل للشركة فى البلدان الاستوائية من ٢-٣ شهور. بحلول الشهر الثانى او الثالث من تاريخ الشحن من امريكا فان معظم الخلايا يفترض ان تكون ماتت فعلا وان البروتين او البللورات السامة تكون قد انهارت بالفعل.

لقد اضطلعت المعاهد العاملة فى مجالات بحوث وتطوير التكنولوجيا الحيوية بمهام الاستفادة من المواد المتوفرة محليا والاعتماد على المصادر الذاتية وتحقيق مبدأ الاكتفاء الذاتى مع التركيز على العمل على المبيدات الحشرية الميكروبية للاجابة على التحديات والاستفسارات التى وردت من قبل الزراع. بعد تطوير عزلة Bt لمكافحة يرقات البعوض

(PG-14 موريسونى والطرز السيرولوجى H8a: 8b) وثاقبة الذرة (LEP20 كورستاكى الطرز السيرولوجى H3a : 3b) تجسمت المشكلةفى الحاجة لاجهزة متقدمة للانتاج الكبير خاصـــة وحـــدات الـــتخمر والطرد المركزى والمجففات الرشاشة. هذة الامكانيات مرتفعة التكاليف وتصبح اكثر تكلفة اذا كان السوق المحلى هو الهدف.

REFERENCES

De Barjac, H. (1978). Un nouvelle variete de *Bacillus thuringiensis* tres toxique pour les moustiques : *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis serotype 14. C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D, 286, 797-800.

Dulmage, H.D. and Cooperators. (1981). Insecticidal activity of the isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential use in pest control, 193-211. In : H.D. Burges (ed.), Microbial control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980. Academic Press, London.

Faust, R.M. and Bulla, L.A. Jr. (1982). Bacteria and their toxins as insecticides. Dekker, N.Y.

Gabriel, B.P. (1968). Entomogenous microorganisms in the Philippines : new and past records. Philipp. Entomol., 1, 97-130.

Gabriel, B.P. (1970). Additional record on the microbiota of Philippine insects. Philipp. Entomol.. 1. 465-472.

Goldberg, L.J. and Margalit, V.F. (1977). A bacterial spore demonstrating repid larvicidal activity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univitatuss, Ades aegypti, and Culex pipiens. Mosq. News,* 37, 355-358.

Heimpel, A.M. (1967). A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol., 12, 287-233.

Hermstadt, C. ; Soares, G.G. ; Wilcox, E.R. and Edwards, D.L. (1986). A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against against coleopteran insects. Bio/Technologt, 4, 305-308.

Ibarra, J.E. and Federici, B.A. (1986). Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis are similar in protein composition and toxicity. FEMS Microbiol. Lett., 34, 79-84.

IRRI Highlights. (1986). *Bacillus thuringiensis* : an indigenous microbial pesticide, 16-17.

Krieg, A. ; Huger, A.M. ; Langenbruch, G.A. and Schnetter, W. (1983). *Bacillus thuringiensis* VAR. TENEBRIONIS : EIN NEUER, GEGENUBER Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. angew. Ent., 96, 500-508.

Lacey, L.A. and Singer , S. (1982). Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus Sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-1) against anopheline and culicine mosquitoes. Mosq. New, 42, 537-543.

Lacey, L.A. and Oldacre, S.L. (1983). The effect of temperature, larval age, and species of mosquito on the activity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* var. darmstadiensis toxic for mosquito larvae Mosq. New, 43, 176-180.

Lacey, L.A. ; Lacey, C.M. and Padua, L.E. (1988). Host range and selected factors influencing the mosquito larvicidal activity of the PG-14 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. morrisoni. J. Am. Mosq. Cont. Assoc., 3, 39-43.

Pacumbaba, E.P. and Padua, L.E. (1987). Screening of *Bacillus thuringiensis* isolates against coconut slug caterpillars (Lepidoptera: Limacodidae). Proc. 11th Internal. Cong. Plant Prot., Manila, Philippines.

Padua, L.E. (1988). Development of microbial pesticide for mosquito control in the Philippines. Proc. Coordination Workshop in Bacterial Control of Agricultural Insect Pests and Vectors of Human Diseases. Ein Gedi, Israel.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1980). The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 36, 180-186.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1984). Isolation of a *Bacillus thuringiensis* (Serotype 8a : 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 44, 12-17.

Padua, L.E. ; Ohba, M. and Aizawa, K. (1988). Comparative serology of crystals produced by PG-14. *Bacillus thuringiensis* subsp. Morrisoni (serotype H. 8a : 8b) and *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis (serotype H-14). J. Invertebr. Pathol., 52, 192-194.

Padua, L.E. ; Gabriel, B.P. ; Aizawa, K. and Ohba, M. (1982). *Bacillus thuringiensis* isolated in the Philippines. Philipp. Entomol., 5, 199-208.

Padua, L.E. ; Ebora, R.V. and Moran, D.G. (1987a). Screening of *Bacillus thuringiensis* against Asiatic corn borer, Ostrinia furnacalis (Guenee) and diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Tech. Bull. No. 103. FETC, Taiwan, Rep. China, 1-7.

Padua, LE. ; Wen, C.X. ; Lizhi, L. and Margalit, V.F. (1987b). The susceptibility of the lepidopterous pests of rice to *Bacillus thuringiensis*. Proc. 11th Internal. Cong. Plant., Manila, Philippines.

Undeen, A,H, and Nagel, W.L. (1978). The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on Simulium larvae in the laboratory. Mosq. News. 38. 524-527.

سادسا: تعريف وتنقية الاكسوتوكسينات الخارجية من تسعة سلالات من بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز

فــي مجــال المنــتجات الحــيوية حــدث تطور كبير في مستحضرات الباسيلليس ثورينجنســيز Bt في مختلف القطاعات الزراعية والصحية والصناعية وكذلك في البحوث الاساســية. يمكن ان تستخدم .B.t على صورة الميكروب الشامل او الجراثيم او البروتين البللورى عن طريق السحق او الخلط مع البيئات المختلفة او بالتكامل في النبات من خلال الهندسة الوراثية. يبدو ان هناك مشاكل مختلفة واجبة الحل لمواجهة التحديات العملية.
- كيف نحدد السمية في المدى ومكان الفعل؟ - كيف يمكن ان تعرف عن التخصيصية وتحمل التوكسينات؟ - التنقية ومشكلة التنشيط بين مختلف المكونات؟- اى التوكسينات تستخدم وكيف تستخدم؟ - اى السلالات تستخدم وبسهولة وبشكل متخصص؟

تمشيا مع محاولات الاجابة عن هذة الاسئلة بدأ دراسة المكونات المختلفة التى تنتج بواســطة بكتريا Bt وتقدير التراكيب المقابلة والتاثير البيوكيميائى والفعل البيولوجي. هكذا قدم البحاث في تونس – معهد الكيمياء الحيوية بكلية العلوم التونيسية السادة B.A.AFEF, .200 Ferid and B. Omr are

النتائج:

لقــد استخدمت البتا–اكسوتوكسين B-exotoxin المنقاه بواسطة Debarjac and Dedonder (١٩٦٨) كــنموذج دراســة يركــز على الاهتمام باستخدام البكتريا في نفس المجــالات الاساســية لتطبــيقات المبيدات. من المعروف ان البيتا–اكسوتوكسين كمشتق للادينوزين تراى فوسفات ATP يثبط تخليق الحامض النووى RNA ويعمل بوجة خاص علــى انــزيمات البولــيمرازيس RNA. اســتخدام الــثلاثة الــنظم الانزيمــية RNA.Polymerases للخمــيرة ساكاروميســيز سيرمنيســيا والانــزيم المــنقى لبكتريا ايشيريشيا كولاى وجدت الحقائق التالية:

١. كل الانزيمات يمكن ان ينشط بواسطة التوكسين الخارجى "اكسوتوكسين".
٢. يعــتمد معدل التنشيط الانزيمى على الانزيم. لقد وجد ان الانزيم الاكثر تثبيطا هو RNA بوليمــيز (A) حيــث امكــن الحصــول علــى ٥٠% نشــاط مــع ٥ ميكروجرام/ملليلتر بينما اختفى النشاط (صفر) مع تركيز ١٠ ميكروجرام/ملليلتر.

الانــزيم RNA . بوليمــيريز (B) اقل تثبيطا اما البوليميرز (٢) يثبط ببطئ كما هو الحال مع RNA بوليميريز لبكتريا E. coli.

٣. فعل التوكسين الخارجي يعتمد على الصفيحة المستخدمة Template.

٤. بوجة عام وجد ان التثبيط من النوع التنافسي.

٥. وجدت نتائج مرتبة مع RNA بوليميريز (B).

عــندما تم التعليم الاشعاعى للتوكسين الخارجى مع التريثيوم اعطى الكروماتوجرام الاشــعاعى الذاتــى autoradiochromatogram مركــبات معلمة مختلفة. كذلك اظهر الكروماتوجــرافى المعــاود للتوكسين الخارجى على جهاز HPLC ذات الوسط المعكوس بالكــربون المشع ك٨،نيوكليتيدات مختلفة. البكتريا تخرج مركبات مختلفة. لقد تمت دراسة تســعة طــرز ســيرولوجية لبكتريا Bt للكشف عن مكونات النيوكليتيرات التى اخرجتها البكــتريا لمعــرفة طرز الاخراج والفعل النسبى لكل مكون. لقد امكن الكشف عن خمسة مكونــات ووجــدت على درجة عالية من التنقية. لقد ثبت اخراج التوكسين الخارجى بيتا بواسطة التسعة طرز سيرولوجية المستخدمة والاخرى المسماه ١ ، ٢ ، ٤ ، ٥ تعتمد على الطــرز الســيرولوجى. المكــون الخــامس كان ينتج بواسطة الطرز T_7 ، T_9 وهو يثبط بوليميريز RNA مع معدل منخفض.

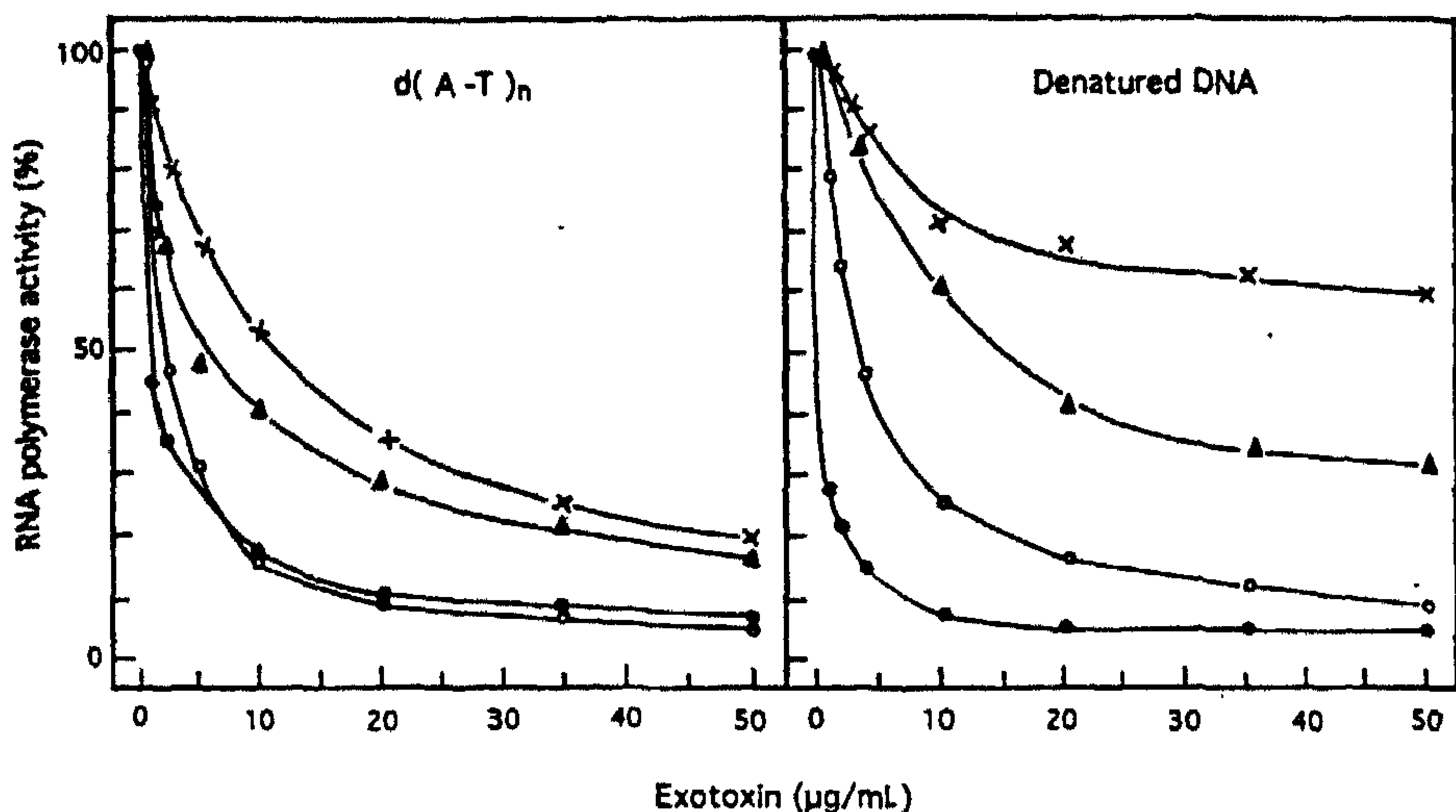
K_i = 5,6. 10-6M for RNA polymerase A of yeast.

K_i = 20,4. 10-6M for RNA polymerase of E. coli.

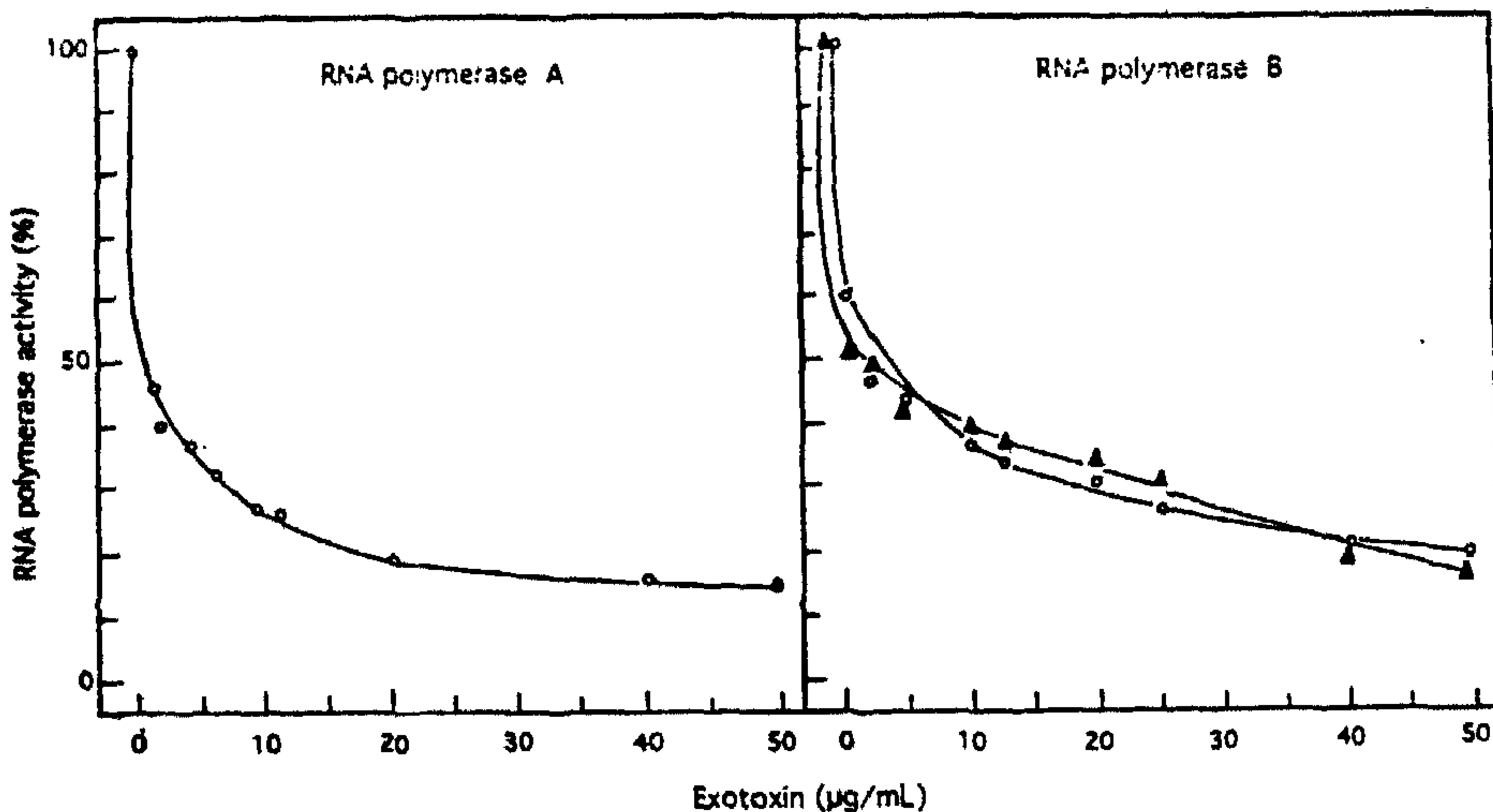
المكونات الثلاثة الاخرى لم يكن لها تاثير على RNA بوليميريز ولكنها سامة على الــنظام الحــيوى المختبر مثل نمو الخميرة (مكون رقم ٤٠) وتطور اليرقات لحشرة ذبابة الفاكهــة (المكونــات ٢،٣،٥). لقــد درس ١٠نــتاج كل مكون تحت مختلف ظروف النمو واماكــن الــتواجد. التنقية العالية للبيتا – اكسوتوكسين والتى تعطى منتج متجانس تسمح باجــراء دراســات بيوكيميائية على النيوكلتيد وموقع الفعل البيولوجى البيتا-اكسوتوكسين تعمل على نشاط RNA بوليميريز حيث تثبط بداية النسخ فى الانزيم المعقد – الصفائح – الوســيط (جدول ٦-١٢) (الاشكال (٦-١٥ ، ١٦ ، ١٧) لقد ترشح فى اذهان كل العاملين فــى مجال بكتريا Bt اهمية التوكسين الداخلى (الدلتا-اندوتوكسين) فى تحقيق الابادة على الحشــرات وضــرورة الحصــول علــيه فى نقاوة عالية مع خلو المستحضر من البيتا-اكسوتوكسين ذات التاثيرات التوكسيكولوجية الخطيرة.

جدول (٦-٢١): انتاج النيوكليترات مع ٢ جم من الخلايا البكتيرية:

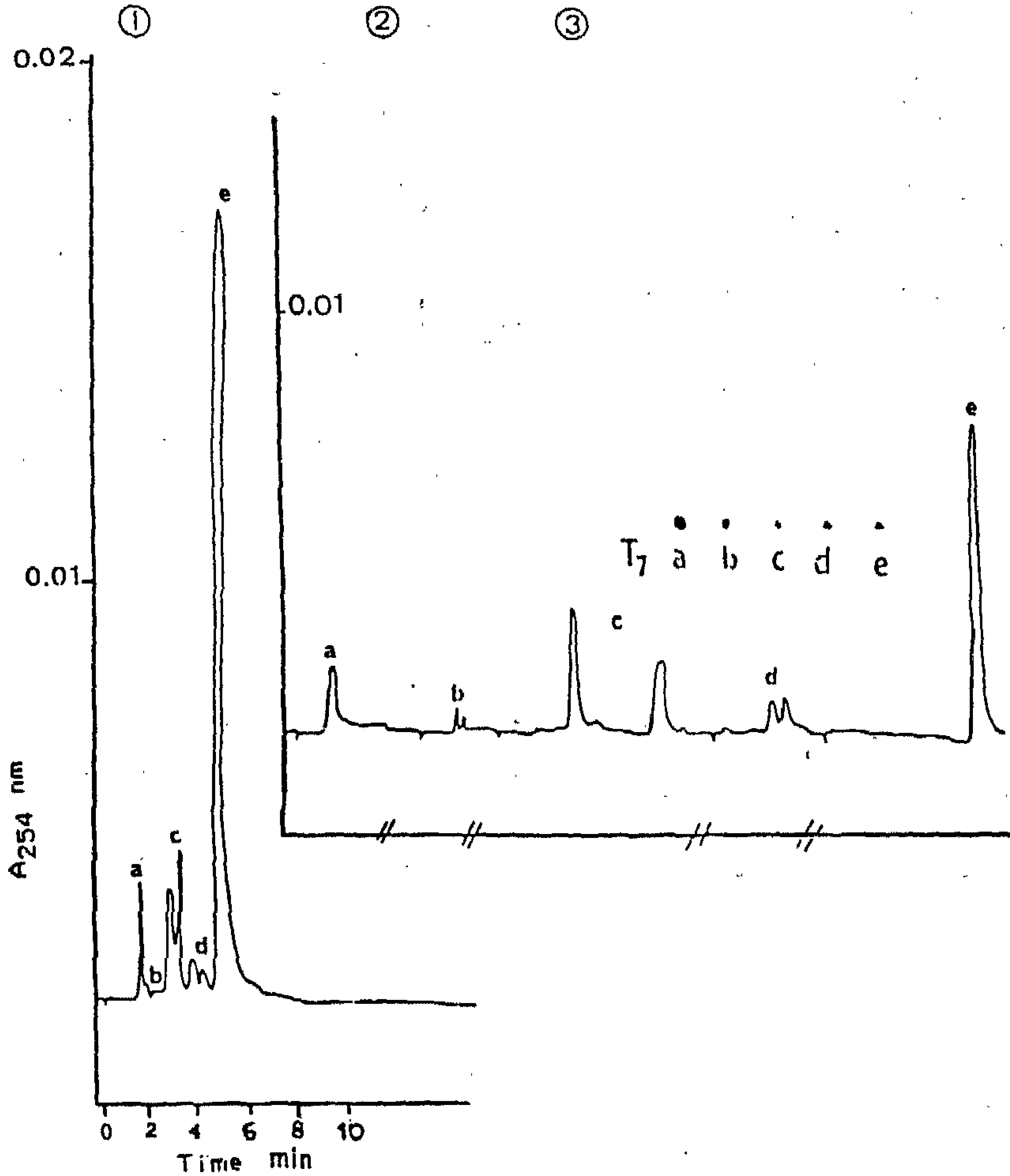
السلالات	الاخراج الكلي	نيوكليتيدات	انتاج النيوكلوتيد
T_1	390	No. 1 0.033 No. 2 0.003 No. 3 0.013 No. 4 0.012	0.320 0.030 0.126 0.117
T_7	1000	No. 1 0.044 No. 2 0.010 No. 3 0.039 No. 4 0.070 No. 5 0.230	1.100 0.270 0.987 0.765 5.750
T_9	1000	No. 1 0.023 No. 2 0.037 No. 3 0.040 No. 4 0.008 No. 5 0.080	0.590 0.940 1.000 0.210 2.120
T_{10}	230	No. 1 0.06 No. 2 0.029 No. 3 0.076	0.340 0.160 0.438
T_{13}	250	No. 1 0.030 No. 2 0.016 No. 3 0.017 No. 4 0.001	0.210 0.104 0.111 0.009
T_{14}	250	No. 1 0.071 No. 2 0.030 No. 3 0.099 No. 4 0.027	0.445 0.187 0.610 0.173
T_{33}	700	No. 1 0.029 No. 2 0.023 No. 3 0.082 No. 4 0.017	0.500 0.410 1.440 0.290
T_{44}	950	No. 1 0.042 No. 2 0.030 No. 3 0.190 No. 4 0.123	1.010 0.910 4.620 2.930
T_{55}	200	No. 1 0.030 No. 2 0.020 No. 3 0.030 No. 4 0.017	0.180 0.110 0.190 0.080



شــكل (٦-١٥) : تأثــير الاكسوتوكســين علــي نشاط بوليمريز الرنا RNA [--o)A(o للخمــيرة والرنا في بوليميريز بكتريا E.coli (x---x) بعد [o),B(*----*), C(^----^)



شكل (٦-١٦) :تأثير الاكسوتوكسين علي تخليق الدانيوكلوتيد pAp U (o----o) والتراي نيوكلوتيد Up Ap U (^----^)



شكل (٦-١٧): كروماتوجرامات جهاز الكروماتوجرافي السائل فائق المقدرة للبيئة النامية التي تم تحضين بكتريا Bt فيها على درجة حرارة ٣٠ْم لمدة ٧٢ ساعة.

- المستخلص الكلي للطرز السيرولوجي T7
- نيوكليتيدات مختلفة ازيحت على جهاز Hplc
- نظام TLC للمكونات المفصولة المختلفة.

سابعا: استخدام التكنولوجيا الحيوية فى مكافحة الافات باستخدام مستحضرات باسيلليس ثورينجنسيز

من مقالة للاستاذ الدكتور عادل مردان – كلية العلوم جامعة عين شمس – مصر. استخدام الوسائل الحيوية فى مكافحة الافات معروفة وموررست منذ فترة طويلة. لقد استخدم الصينييون النمل الفرعونى فى مكافحة الافات فى مخازن الحبوب المخزونة لقد كانت تجلب طيور المياه Mynah الى موريشيوس عام ١٧٦٢ لمكافحة الجراد الاحمر كما استخدمت الكلاب وغيرها من الحيوانات الاخرى لمكافحة الحشرات والقوارض. القطط الاليفة التى كان يعتقد انها من اول الوسائل فى المكافحة الحيوية لعبت دورا كبيرا فى مكافحة الفئران والتى كان انتشارها سببا فى انتشار طاعون البابونى فى اوربا فى العصور الوسطى كما كانت تاثيراتها على الكائنات غير المستهدفة غير متوقعة وفى هذة الازمنة لم تكن هناك اختبارات مطلوبة للتسجيل. استخدام الكائنات الدقيقة كمبيدات ظهر حديثا واثبت بعض النجاحات. فى الوقت الراهن يوجد عدد من انواع البكتريا والفطريات والفيروسات طرحت فى الاسواق كمبيدات تجارية بعد نجاح الانتاج وتجهيز المستحضرات. البكتريا من الوسائل الواعدة فى هذا الخصوص. لقد وصف اكثر من ٩٠ نوع من البكتريا تصيب الحشرات. معظم هذة الانواع تخص عائلات Pseudomonad acea, Enterobacteriaceae, Bacillacease, Micrococcaseae, Lactobacillaceae. غالبية السلالات التجارية تنتمى الى الجنس Bacillus ومعظم المنتجات الواسعة الاستخدام جهزت من الباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) وفيها ما يزيد عن ٢٢ طرز سيرولوجى (يتميز بوجود الانتيجين السوطى). اعضاء هذة المجموعة سامة لحشرات حرشفية وثنائية وغمدية الاجنحة. لقد اكتشفت بكتريا B.t. فى ديدان الحرير فى اليابان فى بداية القرن العشرين، لقدانتج اول مركب تجارى فى فرنسا عام ١٩٣٥ وكان يعتمد على توكسين خطر على الانسان كذلك سمى البيتا-اكسوتوكسين. لقد تم تطوير طرق مختلفة لازالة هذا التوكسين من المنتج النهائى عن طريق تجهيز عملية التخمر. لقد قام Dulmage بعزل بكتريا Bt سلالة HD-1 وهى سلالة Bt كورستاكى خالية من التوكسين الخارجى والذى يمثل الان المادة الفعالة لمعظم السلالات التجارية من بكتريا Bt المستخدمة ضد حشرات حرشفية الاجنحة.

بالرغم من المعلومات المتوفرة عن كفاءة مستحضرات Bt تحت الظروف الحقلية الا انه مازالت هناك قيود لاستخدام المستحضرات البكتيرية الموجودة فى مكافحة اليرقات للعديد من الحشرات. من احد القيود الكبرى صعوبة اقناع رجالات الصناعة لتطوير

مستحضـرات محسنة كاقتراب ثانى حيث ان سوق Bt مازال صغيرا حيث انه يمثل ما يزيد قليلا عن ٠,١% من السوق العالمى للمبيدات ولو ان هذة القيمة تمثل ما يزيد عن ٩٠ % مـن كـل مبـيعات المبيدات الميكروبية. للتغلب على هذه الصعوبة الى جانب القيود الاخـرى مـثل قدرة الانتشار ، مثابرة وقوة البحث عن العائل ومعدل التضاعف ، العنف والثـبات فـى الحقل ، طرق وتكاليف الانتاج وكذلك مقاييس الامان الحيوى فأن استخدام التكنولوجـيا الحـيوية لتطوير وسيلة مبشرة تعتمد على بكتريا Bt تبدو هى الحل. الهدف الحـالى لاستخدام التكنولوجيا الحيوية توجيه المفاهيم العلمية والتكنولوجية مع التركيز على تطويـر استراتيجيات للبيولوجيا الجزئية فى مكافحة الافات. لقد ادى نجاح استخدام العديد مـن التحضـيرات الميكروبـية ضد الافات المستهدفة الى تحفيز البحوث الفعالة فى اتجاه اسـتخدام الكائـنات الحـية فى استراتيجيات الادارة المتكاملة للافات على المدى الطويل. الكائـنات الميكروبية المهندسة وراثيا اصبحت فى المتناول كما تم تطوير تكنولوجيا جديدة للانـتاج الكبـير لهذة الميكروبات. لقد اصبح من الممكن تخليق الجزئيات البيولوجية عن طـريق زرع جيـنات خاصـة فى مختلف انواع الكائنات الدقيقة. من اكثر الاستخدامات الملفـتة للنظر والاثارة فى اتجاهات الهندسة الوراثية ما تتمثل فى تصنيع توكسينات بكتريا Bt باستخدام البكتريا كمصانع. نواحى ومنظور استخدام طرق الهندسة الوراثية فى بحوث مكافحـة الافـات قد تبدا فى ثلاثة اتجاهات هى الحشرات والوسائل الميكروبية والنباتات العائلة.

١ــ **الحشرات:**- دراسة كيفية احداث الفعل على المستوى الجزيئى وفهم اسباب تخصصية التوكسـينات علـى الحشرات المختبرة والعلاقات الخاصة بالتركيب والوظيفة وتمثيل التوكسـين. تصميم الحصول على ممرضات ميكروبية فعالة تتطلب فهم كامل وواعى لكيفـية احـداث بكـتريا Bt للفعل والتاثير وكذلك لتوضيح كيف تتداخل مع الحشرة المسـتهدفة والبيئة. من الامثلة الاخرى لنواحى المناورة بجين التوكسين الحشرى فى مكافحـة الافـات مـا يضـطلع بتقليل اومنع تطور المقاومة تجاه المبيدات الحشرية البكتـيرية وغيرها من الكيميائيات السامة. من المعروف جيدا ان الكائنات الحية تقاوم تاثـيرات المواد السامة عن طريق منع التوكسينات من الوصول الى المواقع المستهدفة او بواسـطة تحويـر الموقع بما يحقق خفض حساسيته للتوكسين. تمثيل المواد السامة تعتـبر من التقنيات الشائعة لمنع السم من الوصول الى الموقع المستهدف. العلماء فى

الوقـت الراهن قادرون على كلونة الجين التى يتحكم فى تخليق المقاومة فى الحشرات ومن ثم مساعدتها فى فهم كيفية عمل الجين.

٢- الممرضات الحشرية للباسيلليس (.Entomo pathogers (B.t:

٢-١- المباشرة:

ـ البيولوجـيا الجزيئية تقدم امكانية ليس فقط تحسين اداء هذة الممرضات الطبيعية بمـا يجعلها اكثر ملائمة مع اهدافها ولكن ايضا تحويل الميكروب غير الممرض الـى ممرض مما يقدم اسلحة جديدة فى الترسانة ضد الافات الحشرية. ان ادخال جينات توكسين .B.t فى البكتريا E.coli سوف يخدم فى الانتاج المكثف للتوكسين بالاضافة الى دراسة تداخل التوكسينات المختلفة ومكان احداث الطفرية من وجهة الـنظر الاكاديمية. نقل التوكسينات بين العوائل المختلفة المعتمدة على الباسيلليس سـوف تقدم لنا خدمات افضل فى الحقل ومن ثم يتحقق مدى واسع لبكتريا Bt فى بكـتريا قـادرة على المعيشة والثبات وربما اعادة التدوير فى البيئة. الامل معقود على رؤية حدوث تنشيط وتطوير انشطة جديدة ضد اليرقات. استخدام نفس الهدف مع دمج البروتوبلاست قد يتطلب نظام للتقسيم (التسمية) للمواد المندمجة. يجب ان يكـون فى الاذهان اننا لم نفهم بعد كل النقاط الخفية فى توازن مجاميع الحشرات الـى جانـب المـناورات المعملـية. البحث عن سلالات جديدة خاصة فى الدول الاستوائية او النامية يجب ان تستمر وتتواصل.

ـ لقد امكن تطوير وتحقيق تقدم فى التقييم الحيوى للبلورات المختلفة باستخدام طرق زراعة الانسجة. خلايا انسجة الحشرات تعتبر من النظم الصالحة كنموذج لدراسة الاسـتجابة السـامة للبروتين المنشط من بلورات بكتريا .B.t لقد تم كلونة جينات العديد من توكسينات Bt وتكرارها والتعبير عنها فى البكتريا كما تم تعريف ادنى تـتابع وراثى مطلوب لتشغير بروتين التوكسين كامل الفاعلية. المسرح مهيأ الان للهندسـة الدقـيقة لتوكسـينات Bt اكـثر كفـاءة وفاعلـية. لذلك فان الجرعات الاصـغريمكن ان تسـتخدم فى الحقل لتقليل التكاليف العالية لاستخدام المركب فى الوقـت الراهـن وتوسـيع المدى العوائلى وتحقيق امان اكثر للكائنات الحية غير المستهدفة وتسهيل الانتاج التجارى وتحقيق الثبات المطلوب تحت الظروف الحقلية كذلـك فـان رجـالات البيولوجـيا الجزئيـئة يقومون بنقل جين توكسين Bt فى

البسـيدوموناس غـير المرضية ومن ثم تحويلها الى وسيلة ميكروبية جديدة فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة.

٢- غير مباشرة (الكلونة فى وسائل تكافلية Symbiotic او غيرها:

- مـن الاقترابات المفيدة والفعالة فى اتجاه التطبيق الفعال بشكل اكبر لتوكسينات Bt ذات الفعـل الابادى على الحشرات ما يتمثل فى ادخال والتعبير عن جين التوكسين فـى خلايـا الخميرة. يحدونا الامل فى ان تكنولوجيا دمج DNA سوف تؤدى الى انـتاج مـواد سامة فى البكتريا المناسبة قادرة على التغلب على كل مشاكل وعقبات الوسـائل الموجـودة حاليا فى المكافحة الميكروبية مثل عدم الثبات تحت الظروف الحقلـية وفقـد النشـاط الممـرض بسبب التعرض للتشعيع. الدلتا-اندوتوكسين من السـلالات البكتـيرية المتخصصـة ضد حشرات حرشفية الاجنحة تعتبر فى الوقت الراهـن مـن اكـثر المبيدات الميكروبية التى درست بكثافة واختبرت على سلاسل كبـيرة مـن انـواع حرشـفية الاجنحة. التقييم المناعى مع الاجسام المضادة عديدة واحاديـة الكلونة اوضح ان الببتيدات العديدة متميزة التراكيب للمعلم Mr 130-140 يمكن ان توجد فى سلالة فردية. البروتينات تتحول من خلال التحلل المائى. مجسات DNA والبلازمـيد اسـتخدمت لتوضـيح ان الجينات التى تتحكم فى تغليف وانتاج الـبللورات تقع على عدد صغير من البلازميد ذات الوزن الجزيئى العالى. البروتين السام تم كلونته فى بكتريا B.subtilis, E. coli وتم التعبير عنه حتى خلال مرحلة النمو الخضرى.
- لقـد امكـن دمج او خلط البروتينات من السلالات المختلفة ومن ثم توسعت دائرة نشـاط السـلالة المـندمجة. السلالات الجديدة كلية وجدت ذات فاعلية ضد مجاميع اضـافية مـن الحشرات مثل غمدية الاجنحة المعدية بالبكتريا Tenebrionis B.t. والصـنف سان ديجو. التعبير الاولى لهذة السلالة اشتملت على كلونة والتعبير عن جيـن التوكسـين فى بكتريا E. coli وقد خلص الباحثون الى ان تكنولوجيا مضاها الوراثـة الجزئيـئة يمكن ان تتواصل لتشمل الدنا التى تحتوى على انتاج النيوكلوتيد المشـفر لبروتيـن التوكسين فى بكتريا B.t. s.d. بهدف انتاج الجينات الجديدة التى يحسـن من صفات النسيج والترجمة وتشفير البروتين بما يزيد من السمية او تغيير خصائصية المدى العوائلى. لقد امكن عزل العديد من الجينات للبروتين السام كما تم تحديـد تـتابع الحمض الامينى للموقع الفعال للبروتين من تتابع الدنا المتتابع للجين

وتحديــد تركيــب الــبللورة . كيفية الفعل على المستوى الجزيئى لم يثبت بعد ولكن المســتقبلات مثل الفوسفات تيديل كولين و ن - استيايل جالاكتوسامين قد تكون هى الموقــع المســتهدفة للتوكيــن. لقد تمت الاشارة الى امكانية استخدام رسوم الحاسب الالى لعمل نموذج التداخل بين التوكسين والمستقبلات فى الحشرات والتى تؤدى الى التنــبؤ بتراكيــب البروتين ذات الابادة على الحشرات. بعد موضة التركيب الثانوى والــثلاثى للبروتيــن وصــف الموقــع الفعال وهذا يؤدى الى التعود على استخدام المبــيدات الحشــرية الحيوية. طرق التكنولوجيا الحيوية الجديدة قد تحدث اسهام من خــلال زيــادة الكفــاءة عن طريق تحوير تكامل بلازميد البكتريا التى تكافح تخليق البروتين. هذا يقلل من تكلفة الانتاج ويحقق ويفتح مجال للمستحضرات الجديدة سهلة الاســتخدام كبديل فان انتاج السلالات التى لا تكون الجراثيم asporogenic قد تقلل مــن تكاليف الانتاج عن طريق تفادى طاقة التمثيل الضائعة فى انتاج الجراثيم بجعل المنتج اكثر قبولا فى بعض الدول.

- على المدى القصير قد يمكن تطوير منتجات تستهدف مواضع متخصصة اكثر. فى عــام ١٩٨٥ نجحــت شركة ساندوز فى الاختبار الحقلى لمركب جديد تحت الاسم Javelin وهــو مبــنى علــى سلالة NRD-12, a3A3B والتى اكتشفت بواسطة Norman Dubois فــى شــركة خدمات الغابات الامريكية. بالغرم من ان السلالة كانــت قد اكتشفت وتم توصيف خصائصها وتاثيراتها المتزايدة ضد الفراشة الغجرية فــان التاثــيرات المحســنة للجافليليــن كانت ضد دودة ورق القطن وهى افة تضر بالخضراوات وفى بعض البلدان التى تزرع القطن. بعض المنتجات الجديدة لمكافحة حشــرات غمدية الاجنحة التى تتكون من السلالتين المذكورتين اعلاه وجدت مجالا فى الاسواق المختلفة خاصة لمكافحة خنفساء كلورادو البطاطس.

٢-٣- النباتات المحصولية Crop plants:

النــباتات المهندسة وراثيا المقاومة للحشرات قد تشهد اليوم الذى يثبت فيه اما نها وتعتــبر الــبديل الامــن والرخــيص لاستخدام الكيميائيات التوكسينية فى مكافحة الحشــرات. ان تطويــر نــاقلات ذات اصــغر بلازميد Ti يحتوى على معلمات منتخــبة متعددة السيادة ومواقع مكلونة وكذلك محفزات او بادئات فعالة واشارات A العديد ذات تيار متدفق من اجربكتيريوم تعول التحول النباتى. الطرق الاضافية تشــمل الحقن الدقيق والتثقيب الكهربى وتحفيز الجسيم قد يجعل من الممكن تحقيق

التحول النباتى وهو غالبا ما يكون تحول اتجاه المقاومة بواسطة اقتراب الاجروباكتيريوم بالاضافة الى التحول هناك تحدى اخر يتمثل فى ان نتعلم كيف يفيد تخليق نباتات ناضجة من الخلايا المتحولة او البروتوبلاست. فى الوقت الحالى يوجد نماذج نباتية جيدة يمكن ان تستخدم لوضع استراتيجية للهندسة الوراثية بغرض مكافحة الافات. الادخال الناجح لجينات توكسين بكتريا B.t. فى الدخان تؤدى الى الحصول على نباتات عادية مقاومة لدودة قرون الدخان.

عامل الخطر فى المبيدات الميكروبية المهندسة وراثيا Risk Facctor:

عند اختبار وتقييم الخطر المرتبط بهذة المبيدات يكون ممكنا تعريف مجموعة من العوامل العامة التى قد تساهم فى حدوث الخطر. بسبب ان كل مركب ونظام استخداماتة محددة ومميزة فان عوامل الخطر هذة يجب ان تؤخذ فى الاعتبار على اساس كل حالة بمفردها Case-by-case basis. احتراما للتشريعات والاختبارات المسبقة للمبيدات الميكروبية التى عرفت قبلا.

١. بسبب الطبيعة الاساسية الوراثية كمبيدات للافات فان هذة الكائنات مرجو منها ان تكون ذات نشاط بيولوجى. هذة المنتجات قد تكافح الافات عن طريق طرق مختلفة من الفعل مثل : القتل – احداث المرض–المنافسة او الاحلال–منع التغذية – تثبيط النمو–التاثيرات المعاكسة على التناسل. علاوة على ذلك فان الكائنات الدقيقة تصمم للاستخدامات البيئية والتى يمكن ان تستخدم على المحاصيل الغذائية والغابات او المراعى وكذلك فى مكافحة ناقلات الامراض وبالقرب من اماكن السكنى. لذلك فان التعرض للكائنات غير المستهدفة والانسان قد يكون كبيرا.

٢. على خلاف المبيدات الكيميائية فان الميكروبات تعيش فى الكون حيث تستمر فى الحياه وتتضاعف. بمجرد ان تنطلق فى البيئة فان المنع الكامل او المطلق لانتشارها يصبح غير ممكنا. لذلك فانة قبل اطلاق الميكروبات المهندسة وراثيا فان مقدرتها على التكيف وايجاد اوساط بيئية جديدة او المقدرة على المنافسة مع غيرها من الكائنات الدقيقة فى البيئة يجب ان تقيم بعناية. اى تقييم للتاثيرات البيئية يجب ان تؤخذ فى الاعتبار من حيث المستويات المتوقعة لقواعد الكائن فى البيئة بالاضافة الى نمذجة تمكن من التنبوءات العقلانية عن تاثير الظروف البيئية غير العادية وتاثيرها على الزيادات المحلية او الانفجار فى مجموع الميكروبات.

٣. اى نظـام اختبار لتوصيف الميكروبات المهندسة وراثيا او تقييم تاثيراتها على او الـتعرض للكائـنات غـير المستهدفة فى بيئة او وسط جديد يمكن ان تؤدى الى تتابعات غير متوقعة. لذلك فان السيناريو الايكولوجى لاى تطبيق مقترح للكائنات المهندسـة وراثـيا يجـب ان تقيم بعناية باستخدام الاقترانات من فروع المعرفة المختلفة.

٤. بعـض انـوع الناقلات المهندسة وراثيا ذات احتمالات عالية للنقل الوراثى. مثال ذلـك الـتحول مـع مـدى واسع من العوائل تعتبر من العناصر الوراثية للحركة الكروموسـومية والـتى تمكـن مـن تسهيل النقل من كائن لاخر. هذا قد يؤدى مشـكلتان: ادخـال الجينات قد يعبر عنه فى انواع اخرى من الكائنات الدقيقة فى البيـئة بالاضافة الى انه قد تنتج نسخ متضاعفة من الجين فى نوع ما من الكائنات الدقيقة مما يزيد من النشاط.

٥. بعـض المبـيدات الميكروبـية المهندسـة وراثيا قد تزيد من الفاعلية ضد الافة المسـتهدفة او قد تدخل نوعين من التوكسينات فى كائن واحد. حتى لو كان المدى العوائلـى للكائن غير المهندس وراثيا وتاثيره على الحشرات النافعة معروف فانه مـن المفـيد اعـادة تقييم تاثيرات الكائن المهندس وراثيا من خلال التقييم الحيوى للمرضية واحداث العدوى فى الحشرات النافعة وغير المستهدفة.

٦. المبـيد المـيكروبى المهندس وراثيا الذى قد يتميز بدمج صفات متميزة معينة قد يكـون قـادرا على الثبات فى البيئة فى اوساط جديدة باعداد كافية تسبب تاثيرات معاكسة على الانواع غير المستهدفة.

٧. زيـادة الثـبات البيـئى قد تمثل مشكلة تحت بعض الظروف. مثال ذلك ان جين توكسين بكتريا Bt يمكن ان يغرس فى مستقبل طويل الدوام او سهل التضاعف او فـى العـائل المناسب مثل الطحلب الاخضر المزرق. هذا قد يكون مطلوبا لزيادة فـترة الحياه وتشير توكسين Bt ليرقات البعوض ولكن قد يؤدى الى مشاكل غير مـتوقعة خاصـة اذا كانت السلالة المهندسة وراثيا ليست محدودة فى التخصصية على الافة المستهدفة.

٨. مـع الاسـتخدام العريضة وبعد ان توفى الوسيلة الميكروبية المهندسة وراثيا كل اختـبارات الامـان فـان الافـاة المستهدفة قد تكون سلالات مقاومة للتوكسينات

الميكروبية للدرجة التى تكون عندها ثابتة لفترات طويلة او تسمى وجودها فى البيئة لمستويات عالية.

التوصيات: لتطوير طرق لتقييم وتقليل الخطر من ادخال الكائنات المهندسة وراثيا ضد اليرقات فى البيئة يمكن اتباع الاعتبارات التالية:

١ـ بالاضافة الى الدلائل الموجودة عن اختبارات امان الوسائل الميكروبية فى مكافحة الافات فانة يجب تطوير طرق واقترابات قياسية على خطوات تمكن من اختبار الكفاءة والاماكن للكائنات الدقيقة المهندسة وراثيا من المعمل الى الحقل الاختبارات التى تتعدى نطاق المعمل يجب ان تتحرك تباعاً فى اتجاه: ١- كائنات دقيقة متشابهة ، ٢- صوب زجاجة او عزف نمو ، ٣- تقييم حقلى محدود ومقيد.

٢ـ المنتج المهندس وراثيا يجب ان يعرف بدقة ويختار وينتخب بناء على الصفات المطلوبة بما يسمح بالتقييم المناسب للتاثيرات الايكولوجية.

٣ـ اختبار الجودة للسلالات المهندسة وراثيا يجب ان تتطور بشكل جيد. فى الكائنات الدقيقة التى طورت للتطبيقات البيئية فان مقدرة وكفاءة الانجراف الوراثى يجب ان تمنع او تحجم للدرجة المقبولة تقنيا وفنيا. الوسائل الوراثية المنقولة يجب ان تكون غير متحركة وكما لوحظ قبلا فان ميكانيكيات الحفظ او التحطيم الذاتى يجب ان تهندس فى المبيدات الميكروبية المندمجة.

ثامنا: استخدام الباسيليس ثورينجنسيز فى وقاية النباتات فى مصر مع تاكيد Costraints

فى مقالة للدكتور F.N.Zaki بقسم الافات ووقاية النبات بالمركز القومى للبحوث – الدقى– القاهرة–مصر. الاستخدام الناجح للباسيلليس ثورينجنسيز (B.t.) فى مكافحة الحشرات من رتبة حرشفية الاجنحة مثل دودة ورق القطن والدودة القارضة ودودة القطن الصغرى تكرر تحت الظروف التجريبية الميدانية فى مصر. فى كل التجارب التى اجريت بواسطة الدكتور سلامة ومعاونوه كان يضاف المولاس لمعلقات Bt كى تحقق الانتشار والالتصاق بمعدل ٤لتر/فدان. مع الرشاشات الظهرية و ٥٠٠–٦٠٠ لتر ماء/فدان مع موتورات الرش الارضية. كان الرش يجرى دائما قبل غروب الشمس لتفادى تاثير الاشعة فوق البنفسجية خلال النهار وكذلك لاعطاء اليرقات فرصة للتغذية على الاوراق المرشوشة طول الليل. كان يضاف واحدكيلوجرام من كربونات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم لمحلول الرش مع كل فدان لزيادة فعالية B.t. (سلامة واخرون ١٩٨٥ ، ١٩٨٦ ، ١٩٨٩). لاستخدام الطعوم ضد الدودة القارضة فان الكمية المطلوبة من الدبيبل Dipel مع او ..... المواد الاضافية كانت تضاف للمولاس (٤لتر/فدان) وردة القمح (٢٥ كجم/فدان) مع التسهيل بالماء. كان يتم خلط المكونات بتجانس للتاكد من تجانس توزيع المواد الفعالة فى الطعوم قبل نشرها بين بادرات النباتات. كانت الطعوم تجهز مباشرة قبل التطبيقات الحقلية. فى التجارب الحقلية الموسعة كان يضاف واحد كيلوجرام من كربونات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم (سلامة واخرون ١٩٨٩).

كفاءة مستحضرات Bt فى خفض مجاميع حشرات ابى دقيق الكرنب مع الاصناف المختلفة من الكرنب فى مصر تم تقييمها بواسطة سلامة ومعاونوه ١٩٩١. عندما استخدم المنتج التجارى Dipel-2x (Bt من الصنف كورستاكى HD-1) كمسحوق تعفير سجل افضل النتائج فى مكافحة ابى دقيق الكرنب التى تصيب الكرنب الشتوى. لقد تحقق مكافحة فعالة مع رشة او رشتان من الدبيبل X2 بمعدل ٢٠٠ جم/فدان او ٣ رشات على فترات اسبوعية بمعدل ١٠٠ جم/فدان وانكن حماية الكرنب من هجوم الحشرة. لقد كانت انتاجية الفدان من رؤوس الكرنب للتسويق من الحقول المعاملة بالدبيبل X2 مساحية للانتاجية من الحقول التى عوملت بالمبيدات الحشرية الكيميائية مثل اللانيت او الجاردونا. لقد وجد سلامة واخرون ان معدل الاستخدام الفعال للدبيبل X2 لمكافحة الدودة القارضة على بعض الخضراوات كان ٢٥٠ جم/فدان . اضافة بعض المضافات الكيميائية مثل كبريتات الكالسيوم او اكسيد الكالسيوم ادى الى زيادة معنوية فى فعالية الدبيبل X2 على مجاميع

اليرقات. لقد وجد ان اضافة كربونات الكالسيوم او كبريتات الزنك للديبيل X2 ادى الى خفض كبير فى مجموعاليرقات مما نتج عنه زيادة كبيرة فى المحصول لبعض الخضراوات. طعوم 2x–Dipel بمعدل ٢٥٠ جم/فدان كانت اكثر فاعلية على نفس القدر مع المبيدات الحشرية الكيميائية (هو ستايثون) عندما استخدمت بمعدل ١,٥ لتر/فدان .

لقد اجريت تجارب لتقييم تاثير مستحضرين تجارين من بكتريا Bt هما (دبيل وثوروسيد) على مجموع فراشة ورنات البطاطس فى حقول البطاطس بالمقارنة مع مبيدى السيفين والجوزاثيون. معاملات الديبيل والثوروسيد وكذلك الجوزاثيون كانت مقالة فى خفض الاصابة بالفراشة مما ادى الى زيادة فى الانتاجية وتحقيق محصول عالى (صيدر والشريف ١٩٨٧). فى عام ١٩٨١ وجد الحسينى ان المعاملة بالباكتوسبين فى حقول البرسيم كانت فعالة ضد دودة ورق القطن بدون اى فاعلية على المفترسات الموجودة بينما ادت معالمات النوفاكرون الى خفض مقدار الافة والحشرات النافعة. اليرقات التى كانت تعيش لاكثر من ١٠ ايام كانت تعانى من تاخير النمو.

التاجرب الحقلية:

فى عام ١٩٩٠ استخدمت مستحضرات البكتريا المستوردة مثل ديبيل 2x مسحوق قابل للبلل (٣٢٠٠٠ وحدة دولية) ، ديبيل ES معلق قابل للاستحلاب (١٧٦٠٠ وحدة دولية) والمستحضر المحلى Bt من الصنف entomocidus فى مساحة ٧٠ فدان مزروعة بالقطن ضد الدودة القارضة كطعم ورش ضد دودة القطن ، دودة اللوز القرنفلى وكذلك الشوكة. لقد وصلت نسبة الخفض فى مقدار الدودة القارضة ٩٨% وهى ماتحقق مع المبيد الحشرى هو ستائيون. لقد تراوحت نسبة الموت فى دودة ورق القطن من ٥٧ وحتى ٧١% مع المستحضرات المختلفة من بكتريا الباسيلليس B.t. لقد كانت نسبة الاصابة بدودتى اللوز ١٦ ، ٢١ ، ٦٥% فى المساحات التى عوملت ببكتريا Bt ثم المبيد ثم المقارنة على التوالى. لم يظهر المحصول الناتج اختلاف معنوى بين المساحات المعالجة ببكتريا Bt والمبيدات. فى نفس الموسم استخدمت Bt ضد الدودة القارضة ودودة ورق القطن فى مساحة ٦٠ فدان مزروعة بفول الصويا. لقد حدث خفض يزيد عن ٩٠% فى مجموع الدودة القارضة المناطق المعاملة ببكتريا Bt فى مقابل ٨٢,٧-٩١,٣% خفضة فى مقدار دودة ورق القطن مع المعاملة ببكتريا Bt بينما احدثت المعاملة بالمبيدات الكيميائية خفض ٩٥,٧% فى التعداد. لقد زاد المحصول مع اجراء رشتان من بكتريا Bt ضد دودة ورق القطن.

فـــى عام ١٩٩١ اجريت تجربتان بواسطة سلامة ومعاونوه فى حقول القطن وفول الصـــويا باســـتخدام بكتريا Bt لقد تم رش مساحة ٢٨ فدان مزروعة بالقطن فى محافظة الدقهلـــية بمركب ديبيل x2 ضد دودة ورق القطن مع معدل ٧٥٠ جم/فدان. كذلك تم رش فـــدان قطـــن بالمركب المحلى Bt من الصنف entomocidus. اجريت ثلاثة رشات كل اســبوعان مـــرة. فـــى الفيوم ثم رش ٢٨ فدان قطن بمركب ديبيل ٨ الى (١٧٦٠٠ وحدة دولية) بمعدل ٧٥٠ ملليلتر/فدان ضد ديدان اللوز. فى هذة المساحة ثم اجراء ٣-٥ رشات وقورنـــت النـــتائج بالمبـــيدات الكيميائـــية. فى محافظة المنوفية ثم رش مساحة ١٥ فدان مـــزروعة بفول الصويا مرة او مرتان بمركب ديبيل x2 ضد دودة القطن. اظهرت النتائج ان نســـب الموت فى دودة ورق القطن فى التجربة الاولى كانت ١٠٠ ، ٩٥ ، ٨٠% مع الرشـــات الاولى والثانية والثالثة على القطن على التوالى.لقد كان محصول القطن فى هذة الـــتجربة اعلى حصة فى المساحات الاخرى حيث تم جمع لطع دودة ورق القطن يدويا . لقـــد وجـــد ان ٤ او ٥ رشـــات ادت الى خفض بدير ان اللوز بالمقارنة بالمساحات التى عوملـــت بالمبـــيدات الحشرية كما كان المحصول اعلى. اظهرت تجارب فول الصويا ان نسـبة المـــوت فـــى المساحات المعالجة ببكتريا Bt كانت اقل منها فى المساحات المالجة باللانيـــت. لقد تم تسجيل اختلافات غير معنوية فى المحصول فى المساحات التى عوملت مرتان ببكتريا Bt وتلك التى عوملت باللانيت.

الثبات فى الحقل Persistence in the field:

الثبات القليل لبكتريا Bt فى الحقل يمثل المشكلة الكبرى التى تعيق استخدامها بشكل فعـــال فى مكافحة الافات. فى عام ١٩٨٣ قام سلامة ومعاونوه بداسة ثبات المستحضرات المخـــتلفة مـــن جراثـــيم Bt بعد رش زراعات القطن فى مصر. لقد وجد البحاث خفض ملحـــوظ بعـــد يـــوم واحد من الرش وكان الانحدار فى حيوية الجراثيم يتقدم بمرور وقت الـــتعرض فـــى الحقـــل. لقد تراوحت نصف فترة حياه الجراثيم لمستحضرات بكتريا Bt المختبرة ما بين ٧٥ وحتى ٢٥٦ ساعة ولم تمكن البحاث من ايجاد علاقة بين هذا المعيار ودرجـــات الحـــرارة علـــى سطح اوراق القطن المعرضة للشمس. يبدو ان الاشعة فوق البنفســـجية هـــى العامل الاساسى الذى يؤثر على حيوية الجراثيم. لقد اجرى قياس لحيوية جراثـــيم مستحضرات بكتريا Bt على فترات مختلفة بعد الرش فى زراعات القطن خلال موســـمى ٨٠ ، ١٩٨١. لقد قام سلامة وزكى (١٩٨٥) بتقدير موت اليرقات الصغيرة من دودة ورق القطـــن وعلاقـــتها بالقـــياس الحقلـــى ومايستتبعة من هدم فى جراثيم Bt فى

المستحضـــرات علـــى اوراق نـــباتات القطن. لقد وجد ان المستحضرات المختلفة من Bt تختلف فى درجة الحماية من ضوء الشمس وكانت كفاءتها غير ثابتة فى بعض الاحيان لقد وجـــد ان انحـــدار حـــيوية الجراثـــيم كان يتناسب طرديا مع موت اليرقات وهذا لا يعنى بالضـــرورة ان الســـمية علـــى الحشرات ترتبط فقط بحيوية الجراثيم. لقد اتضح ان ضوء الشـــمس هو العامل الاكبر والاساسى الذى يؤثر على حيوية الجراثيم. لقد ذكر البحاث ان اســـتخدام المواد الاضافية او منشطات التغذية مثل الكواكى او مستخلصات اوراق نباتات القطـــن او لـــب الجنازى ادت الى زيادة الفاعلية لمستحضرات Bt على دودة ورق القطن بدرجـــة تعرض النقص الذى تحدثة انهيار الجراثيم عن طريق زيادة التناول وتحقيق زيادة الموت ولكنها لا تعمل كوافيات من الاعتبار بواسطة ضوء الشمس.

مخاليط بكتريا الباسيلليس Bt مع المبيدات الحشرية الكيميائية:

فـــى اســـتخدام مخاليط المبيدات الحيوية والكيميائية تعتمد على التوافق فيما بينها " Compatibilty". فـــى عـــام ١٩٨٤ قـــام سلامة ومعاونوه بدراسة تاثير بعض المبيدات الحشـــرية المختارة على تجرثمة بكتريا Bt من الصنف entomocidus وتاثير مخاليطها علـــى دودة ورق القطـــن اظهرت النتائج ان من بين الكاربامات المختبرة كان الكارباريل اكـــثرها ضـــررا علـــى عملية تجرثم Bt عن المثيونيل داخل المبيدات الفوسفورية احدث التوكسين تثبيط فى التجرثم اقل مما يحدث البروفينوفوس مجموعة البيرثريودز التى تمثلها الفينتالـــيرات والســـيبرمثرين والبيرثريـــن اظهـــرت تاثيرات ضارة اقل على تجرثم Bt بالمقارنـــة بالمجامـــيع الاخـــرى . لقد وجد نفس البحاث ان البيرثريودز ومعظم المبيدات الفوسفورية العضوية المختبرة احدثت تقوية فى فاعلية بكتريا Bt التى استخدمت ضد دودة ورق القطـــن. لقـــد وجـــدوا ان الكاربامات والدايفلو بنزيرون ومخلوط الميثوميل والدايفلو بـــنزيرون ذات تاثـــير اضـــافى عـــندما استخدما معا سلالات بكتريا Bt . التاثير البسيط للبـــيرثريودز علـــى عملـــية التجرثم للبكتريا Bt بالمقارنة بما احدثة الاقسام الاخرى من المبيدات الحشرية ادى الى الاقتراح بحدوث قليل من التداخل او عدم حدوثة مع ايكولوجية ودوام هذة البكتريا النافعة على مكان احداث الفعل. التداخلات التنشيطية ادت الى الاقتراح بان استخدام البيرثريودز مع Bt قد تكون وسيلة امنة وفعالة فى مكافحة دودة ورق القطن.

لقـــد اجريـــت دراسات عن تاثير مخاليط الجرعات تحت القاتلة من فيروس البولى هيدروســـيز الفـــورى وبكـــتريا Bt علـــى العمر الثانى ليرقات دودة ورق القطن (سلامة

واخـــرون ١٩٨٧). لقـــد اظهر التقييم الحيوى ان كفاءة Bt من الصنف entomocidus HD-635 كانـــت اعلى من Bt الصنف جاليرى HD-129 مخاليط SLNPV, Bt HD-129 اظهـــرت تاثـــير تضـــاد بيـــنما مخاليط SLNPV, Bt HD-635 اظهرت تاثيرات اضـــافية. الجرعة النصفية (LD50) لاصناف Bt تناقصت مع زيادة جرعة الفيروس فى المخلـــوط. الاســـتخدام المتزامـــن لفيروس SLNPV وبكتريا Bt خاصة مع التركيزات المنخفضـــة التى اظهرت تاثير اضافى على يرقات دودة ورق القطن قد تكون مفيدة وفعالة فى مكافحة هذة الافة الضارة.

REFERENCES

El-Husseini, M.M. (1981). New approach to control the cotton leafworm, Spodoptera littoralis by Bacillus thruingiensis in clover fields. Bull ent. Soc. Egypt. Econ. Ser., 12 , 1-6.

Haydar, M.F. and El-Sherif, L.S. (1987). Microbial control of the potato tuber worm, phthorimiae operculella in the field. Bull. Ent. Soc. Egypt. Econ ser., 16, 127-132.

Salama, H.S. ; Matter, M. ; Zaki, F.N. and Salem, S. (1991). Field evaluation of Bacillus thruingiensis for control of pieris rapae on two varieties of cabbage in Egypt. Discovery and Innovation, 3 (1), 71-76.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1991). Utilization of Bacillus thruingiensis to control the cotton leafworm in cotton and soybean and the bollworms in cotton in Dakahlia, Fayoum and Menofia governorates, Report from N.R.C., Cairo.

Salama, H.S. ; Salem, S. ; Zaki, F.N. and Matter, M. (1990). Control of Agrotis ypsilon on some vegetable crops in Egypt using the mictobial agent Bacillus thruingiensis anz. Schadlingskde, pflanzenschutz, umweltschutz, 63, 147-151.

Salama, H.S. ; Moawad, S.M. and Zaki, F.N. (1987). Effects of nuclear polyhedrosis virus, Bacillus thruingiensis combinations on spodoptera littiralis. J. Appl. Ent., 104, 23-27.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1985). Application of Bacillus thruingiensis and its potency for the control of spodoptera littoralis. Z. ang. Ent., 99, 425-431.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Zaki, F.N. and Moawad, S. (1984). Potency of combinations of Bacillus thruingiensis and chemical insecticides on spodoptera littoralis. J. Econ. Entomol., 77, 885-890.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. ; Zaki, F.N. and Khalafallah, A. (1983). Persistance of Bacillus thruingiensis spores in cotton cultivations. Z. ang. Ent., 95, 321-326.

تاسعا: قبول الفلاحين لتطبيقات المكافحة الميكروبية فى مصر

مـن مقالـة للدكتور S.A.Salem بالمركز القومى للبحوث - مصر حيث العنوان مثـير وهـام. لقد قدم سيلدتة للمقالة بانة من بين الانشطة الهامة فى المجال الزراعى فى مصـر اختلاف الانتاج الغذائى مكانا هاما يتم ضرورة زيادة بما يتلائم مع الزيادة السكانية الرهيـنة وبمـا يحقـق الامن الغذائى للمريبين. من التحديات التى تعرض هذا السبيل الفقد الرهيب الذى تسببة الاصابة بالافات فى الزراعات المختلفة قبل الحصاد وكذلك العقد الذى يحـدث بعد الحصاد واثناء التخزين. لقد تم تطوير طرق مختلفة من بينها استخدام المبيدات الكيميائـية فـى الـزراعة فـى مصر لاضرار التى تحدثها المبيدات على البيئة والانسان والحـيوان معرفة تماما لذاك فان التغيير فى اتجاه استخدام الوسائل الحيوية او نظم الادارة المتكاملة للافات تلقى القبول والتشجيع فى هذا المقام فان تطور وسائل المكافحة الميكروبية خاصـة الباسيلليس ثورينجنسيز كى تستخدم على نطاق واسع ضد بعض الافات الحشرية مـن حرشـفية الاجـنحة لاقت الكثير من الاهتمام خلال السنوات العشر الاخيرة من قبل الـبحاث فـى المركز القومى للبحوث وغيرة من المعاهد البحثية والجامعات المصرية لقد اجريـت سلاسل من التجارب الحقلية الواسعة باستخدام الباسيلليس ثورينجنسيز ضد اخطر الافات الحشرية التى تهاجم محاصيل القطن وفول الصويا وغيرها من المحاصيل الزيتية. لقد تمت مقارنة النتائج مع تلك المحصل عليها مع المبيدات الحشرية الكيميائية.

اظهـرت الدراسـة ان الفلاحيـن فـى مختلف محافظات مصر على دراسة كاملة بالاهمـية الكـبرى للافات الحشرية التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة مثل دودة ورق القطن وديـدان اللـوز. كذلـك هناك قناعة كاملة لدى الفلاحين عن الاخطار الكبيرة التى تحدثها المبـيدات على الجانب الاخر اتضح ضألة وقلة المعلومات عن اقترابات المكافحة الحيوية باسـتثناء بعض نواحى المعرفة عن بعض انواع الطيور التى تفترس الافات. لقد كان هذا نفـس الوضع فى العديد من الدول الافريقية (Saxena واخرون ١٩٨٩). لقد ادى استخدام مستحضـرات Bt علـى المحاصـيل المختلفة الى نجاحات كبيرة. لقد اجريت العديد من التجارب الميدانية لثلاثة سنوات متتالية وكانت مشاركة الفلاحين من البداية وحتى الحصاد هامـة لخلـق الثقة فى هذا الاقتراب. فى السنة الاولى كان هناك تخوف لدى الفلاحين من استخدام Bt بسبب عدم تحقيق النقل الفورى كما هو الحال مع المبيدات الكيميائية وبعد ذلك وفـى السنوات التالية تغير المفهوم وتولد القبول لدرجة اصبح الفلاحون يفضلون الوسائل الحيوية بدلا من المبيدات.

REFERENCES

Sexena, K.N. ; Pala Okeyo, A. ; Seshu Reddy, K. ; Emolo, E. and Ngode, L. (1989). Insect pest management and socio-economic circumstances of small Insect Sci. Applic., 10 (4), 443-462.

Salama, H.S. (1984). Bacillus thruingiensis Berliner and its role as a biological control agent Z. ang. Ent., 98, 206-220.

Salama, H.S. and Zaki, F. (1985). Application of Bacillus thruingiensis for the control of spodoptera littoralis. Z. ang. Ent., 99 (4), 425-431.

Salama, H.S. ; Foda, M.S. and Sharaby, A. (1989). Potentiation of Bacillus thruingiensis andotoxin against he greasy cutworm agrotis ypsilon Z. ang. Ent., 108. 372-380.

عاشرا: خصائص تمثيل الباسيلليس ثورينجنسيز خلال التخمر المغمور

من مقالة Xie Tianjian, Ma Tianlian, Xie Xinzhu and yang ziwen من اكاديميـــة هـــيونى للعلـــوم الزراعية وكلية التكنولوجيا الكيميائية فى شرق الصين. لقد قدم الـــبحاث للمقالـــة بـــان الباســـيلليس ثورينجنسيز (B.t.) تعتبر مبيد امن للانسان والحيوان ولايلـــوث البيـــئة او يحـــدث ضـــرر للاعـــداء الطبيعية. لقد اجريت العديد من الابحاث والدراسات على انتاج واستخدام بكتريا .B.t فى الصين تم تطوير عملية التخمر المغمور للانـــتاج الواسع على المدى الطويل لقد استخدمت بيئة ذات تركيز منخفض فى البداية مع عـــد جراثيم ٢,٥×١٠^٩ جراثيم / ملليلتر. لقد حدث تطور كبير مع تحسين في تكوين البيئة وعملـــية الـــتخمر. لقد تم تقدير العديد من المعايير خلال مراحل النمو المختلفة لبكتريا Bt وتم تحليل العلاقات الخاصة بها على النحو التالى:

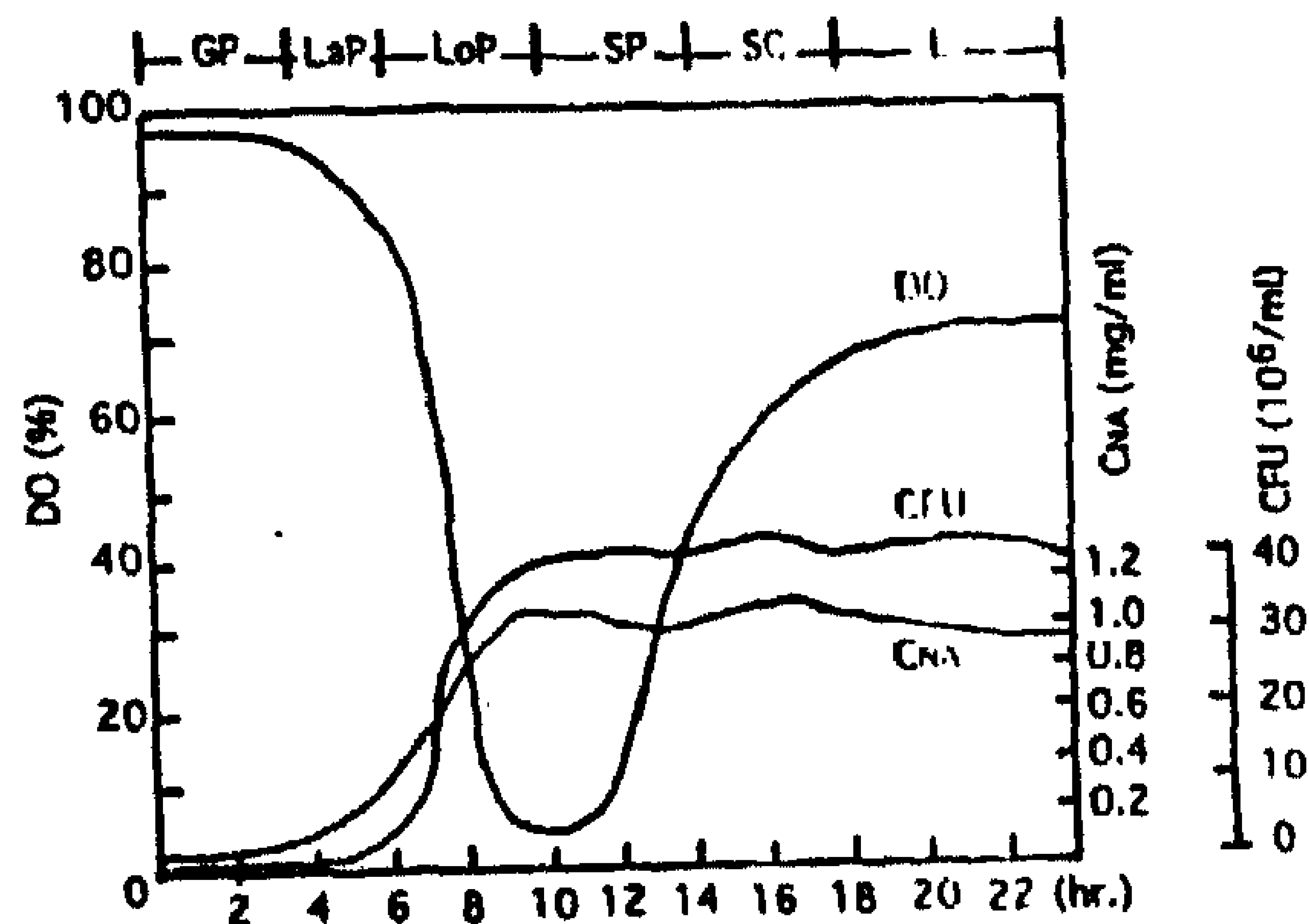
(١) مجمـــوع الخلايـــا والمحـــتوى الكلى من الحمض الكلى من الحمض النووى CAN والاكسجين المذاب DO

اظهرت النتائج ان نظام محتوى الحامض النووى كان متساويا مع نظام نمو بكتريا Bt (الشـــكل ٦-١٨). لقـــد تاكد انه من العقلانية استخدام CNA للتعبير وعكس ما يحدث فـــى مجمـــوع الخلايا. لقد استخدمت الجراثيم مباشرة فى احداث العدوى. خلال الفترة من الـــبداية اى الصفر وحتى اربعة ساعات حدث تطور للاندوسبورات (للجراثيم الداخلية) الى الخلايا الخضرية. لقد كانت CNA وعد الحيوية من بين المستويات المختلفة. الخلايا التى حـــدث فيها تمثيل لا تنقسم وفى الغالب لم يلاحظ تنفس. الاكسجين المذاب DO يظل عند مستوى ١٠٠%. خلال الساعات من ٤-٦ تبدأ الخلايا الخضرية فى التكاثر وتدخل مرحلة السكون Lag phase. مرحلة السكون حدثت من ٨-١٠ ساعات وعندما تصل الخلية الى كـــامل معـــدل نمـــو. لقد كانت زيادة CNA مرتبطة بعد الحيوية.القيمة القصوى لمحتوى الحمض النووى CNA والعد الحيوى كانت ١,١١٤ مللجم/ملليلتر و ٤,٢٥ × ١٠^٨ خلية (CFU)/مللبلـــتر على التوالى. بعد ٩ ساعات من الزراعة حدث خفض كبير فى الاكسجين المذاب ووصل لاقل مستوى ٥% لمدة ساعتان ثم كان اكثر خفضا عن ٢٥,٢% وهى الحد الحرج للاكسجين المذاب. مع طول زيادة المجموع فان نقص الاكسجين المذاب DO يثبط الخلايـــا ولا تســـتمر فـــى النمو. لقد حدث نقص فى معدل النمو ثم توقف وبعدئذ لوحظت مرحلة ثبات. لقد ظلت معايير CFU، CNA ثابتة عند اقصى مستوى. داخل السيتوبلازم الخضـــرى تـــتكون جراثيم اولية وبللورات وتستهلك اكسجين اقل. الاكسجين المذاب DO

يــرتفع ويزداد ثانية ويظل حول النسبة ٧٠% حتى تصل الخلية لمرحلة الانهيار والتحلل. لقد اتضح ان التمثيل يسير بشكل قليل.

(٢) السكر الكلى TS والسكر الباقى RS ودرجة الحموضة PH:

لقد حدث استهلاك قليل جدا فى السكر الكلى خلال نمو او انبات الجراثيم (الشكل ٦ -١٩). لــم يحــدث تغير واضح فى محتوى السكر الكلى والباقى خلال الفترة من البداية وحــتى اربعة ساعات. بعد ذلك ظهرت الخلايا الخضرية واطلقت كمية كبيرة من الانزيم الخلــوى الخارجى. لقد حدث تحلل للكربوهيدات الى الجلوكوز. محتوى السكر الباقى RS ازداد بســرعة ووصـــل لاقصـــى قـــيمة ٣,٤ مللـــيجرام/ملليلتر. يحدث بعد ذلك محتوى للجلوكــوز الى حمض بيروفيك وحمض خليك خلال مسارات PP, EMP. لقد ادى تراكم الحمـــض العضوى الى خفض درجة الحموضة ووصلت الى اقل قيمة ٦,٣ بعد ٧ ساعات مـــع اســتمرار تحول احماض البيروفيك والخليك خلال دورة TCA لانتاج ATP ترتفع الحموضة وتصل الى القيمة ٧,٤ بعد ١٠ ساعات وهى درجة ملائمة التجرثم.ترتفع درجة الحموضـــة تدريجــيا مـــع دوام تـــراكم الاحماض الامينية والامونيا. عند الحصاد كانت الحموضـــة اعلـــى من (٨). يستهلك السكر فى مرحلتى نمو الخلايا والتجرثم ولكن معدل الاستخدام اعلى فى شكل نمو اسى. استهلاك السكر هو الذى يعطى الطاقة ونواتج التمثيل الوســيطة اللازمة لبقاء الخلايا وتكوين الجراثيم والبللورات. تمثيل السكر يلعب دورا فى غايـــة الاهمية فى تكاثر الخلايا. عند الحصاد وصل TS الى ١٧,١ مللجم/ملليلتر. لقد كان معدل الاستخدام ٣٩% هذا يعنى بقاء مكان لاستخدامات لاحقة للكربوهيدات.



شكل (٦-١٨): نظم منحنيات DO, CFU, CAN

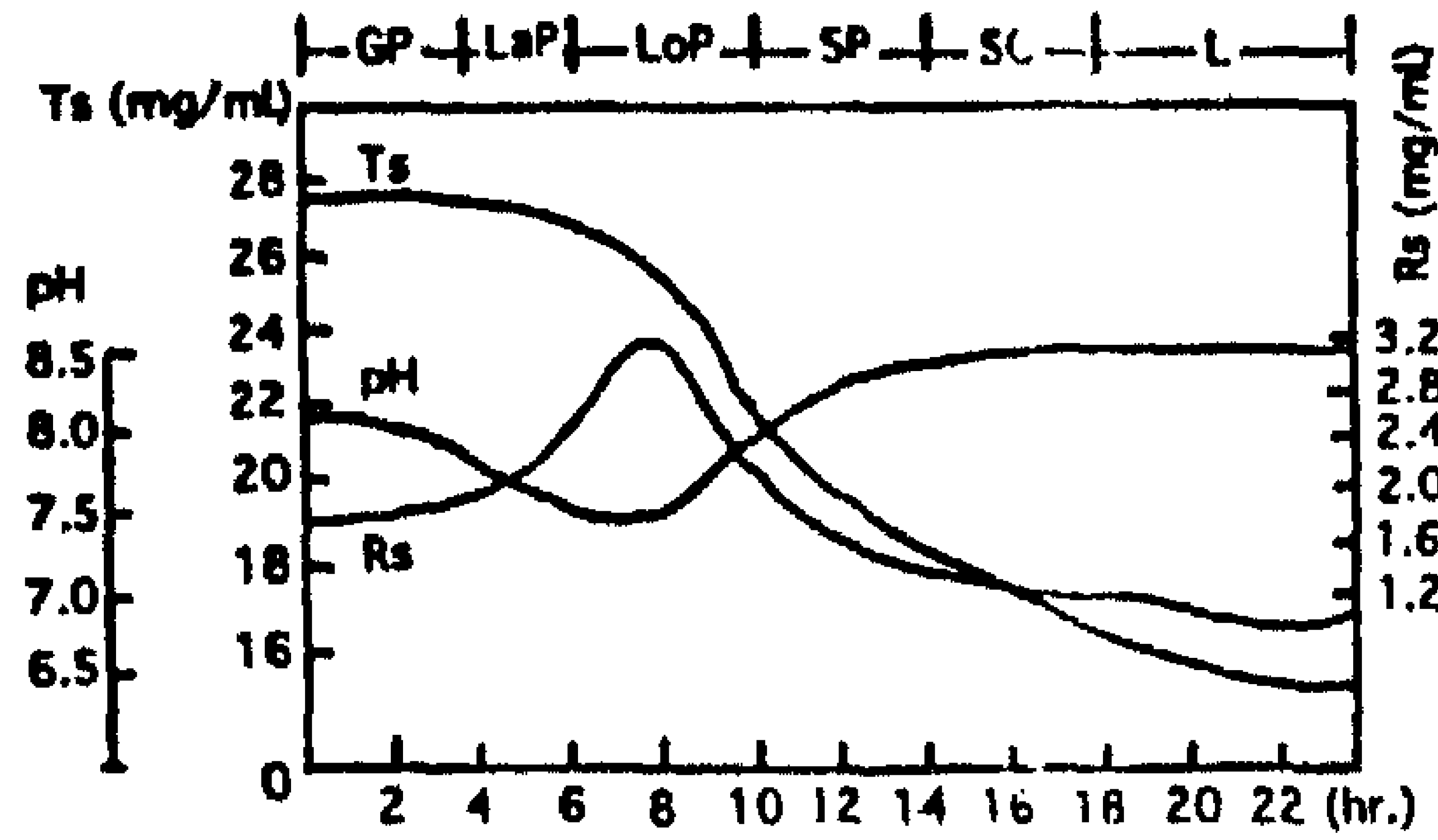


Figure 2. The patterns of Ts, Rs and pH curves.

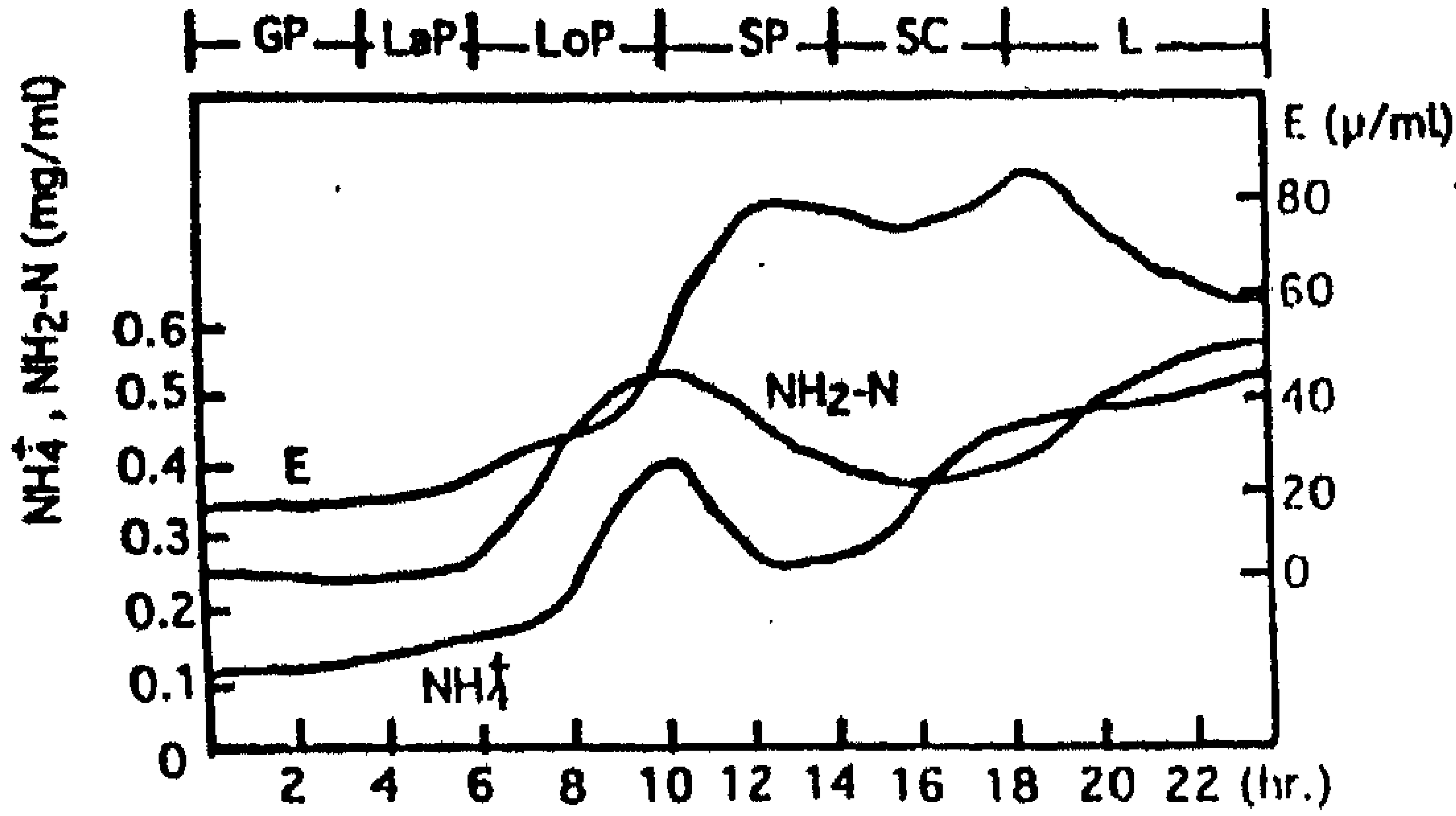
GP = Germination Phase	LaP = Lag Phase	LoP = Log Phase
SP = Stationery Phase	SC = Sporulation Cell	L = Lysis

شكل (٦-١٩) نظم محيات RS, TS الحموضة.

(٣) الحمض الامينى (ن يد٢ – ن) والامونيا (+NH_4) والبروتينيز الخلوى الخارجى(E)

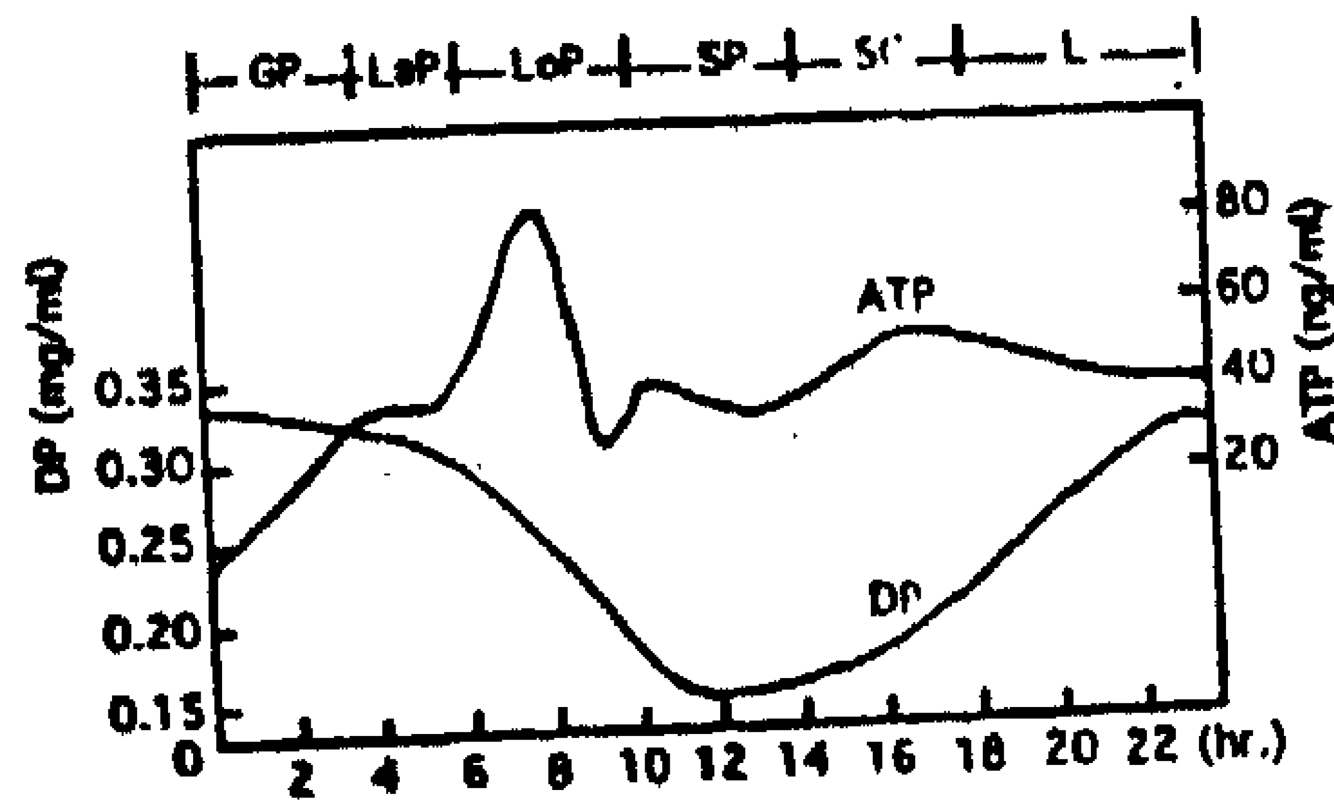
مــع استمرار تكاثر الخلايا يزداد تراكم البروتييز الخلوى الخارجى بالتدريج خلال المــرحلة الســاكنة Lag والمرحلة اللوغاريتمية Log (الشكل ٦-٢٠). مصادر البروتين تحلــل جزئيا الى الاحماض الامينية كما يتحول جزء من الحمض الامينى -L الى الحمض الالفــا-كيــتونى ويدخل دورة TCA المعكوسة. في نفس الوقت تنفرد والامونيا. محتوى الحــامض الاميــنى والامونيا تزداد وتصل لاقصى قيمة مع نهاية المرحلة اللوغاريتمية. خــلال المــرحلة الثانــية يــتوقف التكاثر وتتكون الجراثيم والبللورات. محتوى البروتييز الخلــوى الخارجى يصل للقيمة بعد ساعتان من بداية الوسط او المرحلة الثانية. يتم تحليل واعتــبار مصادر البروتين بشكل كبير. لقد استخدمت كميات كبيرة من الاحماض الامينية والامونــيا لتخلــيق الجــزء البروتينى والبللورات. لقد ادى الاستخدام المستمر الى نقص تراكمها. لقد كان تمثيل النتروجين نشط جدا فى المرحلة الثابتة. قبل الحصاد يتوقف تكوين الجراثيم والبللورات ويحدث تحلل للخلايا. الاحماض الامينية والامونيا التى تنفرد وتتحرر تؤدى الى زيادة فى تركيزاتها.

(٤)الفوسفور المذاب DP والادينوزين تراى فوسفات ATP



شكل (٦-٢٠): نظم منحنيات الحمض الاميني والامونيا والبروتييز الخلوى الخارجى(E)

خـــلال نمو البكتريا Bt يتحول الجلوكوز خلال مسارات EMP ,pp ثم يدخل دورة TCA. الفوســفور مــن العناصـــر الضرورية. محتوى الفوسفور المذاب يتناقص بشكل تدريجــي مع تكاثر الخلايا خارج المرحلة الثانية Lag وحتى المرحلة اللوغاريتمية وهما (الشكل ٦-٢١). بقايا الفوسفور المذاب بعدد ١٢ ساعة كانت ٠,١٥ مللجمملليلتر فقط وهى اقل من نصف المحتوى الاصلى. ليس من الواضح ما اذا كان نقص الفوسفور يثبط تمثيل الكربوهــيدات ويسبب توقف التكاثر بينما تستمر وتتصاعد TS على المستوى العالى. لكن اضـــافة فوسفات البوتاسيوم ثنائى الايدروجين فى الوسط لم يظهر تاثير واضح على تحفيز وزيادة مستوى التخمر .



The patterns of DP and ATP curves.

شكل (٦-٢١): نظم منحنيات ATP, DP

حادى عشر: دراسة عن موائمة الاكسجين المذاب لرفع انتاجية جراثيم باسيلليس ثورينجنسيز بيرل.

من مقالة Xie Tianjian, Ma Tianliang, Xie Xinthu and Ding Qiumei باكاديمية هيوبى للعلوم الزراعية وكلية التكنولوجيا الكيميائية – يوهان-شرق الصين. لقد قدم البحاث للمقالة بالقول انه فى الثمانينات استخدمت بيئات عالية التركيز بشكل فعال لانتاج الباسيلليس ثورينجينسيز (B.t.) فى الصين وكان مستوى التخمر يقرب من ثلاثة امثال اكثر. لقد لعب هذا الاقتراب دورا هاما فى تحسين جودة المنتج وتقليل تكاليف الانتاج. فى الوسط عالى التركيز اظهر تحليل معايير التخمر ان الاكسجين المذاب (DO) ينخفض لمستوى قليل جدا خلال المرحلة اللوغارتمية. نقص الاكسجين المذاب احدث تثبيط فى اى تحسين لاحق لمستوى تخمر Bt . فى هذة الدراسات تاكد الاستهلاك الكبير للاكسجين والحاجة الى توضيح تاثير do على النحو الخلوى. لقد تم تقدير تاثير عمليات ومتغيرات التشغيل الكبرى على معامل نقل الاكسجين المذاب وتاكد من امداد مناسب للاكسجين. اظهرت هذة الدراسة نتائج محددة واجبة الاخذ فى الاعتبار لتحقيق انتاجية عالية بجودة عالية وهى:

١- الحد الحرج للاكسجين المذاب (CDO) ومعدل امتصاص الاكسجين (OUR) فى مختلف مراحل نمو بكتريا الباسيلليس ثورنينجنسيز (B.t.):

لقد وجد ان معيار CDO يقدم معلومات فى غاية الاهمية عن التزويد بالاكسجين فى عملية التخمر. عندما تنخفض قيمة الاكسجين المذاب DO عن هذا الحد الحرج CDO لا تستطيع الخلايا ان تنمو طبيعيا بشكل عادى وهنا يكون الامداد الزائد بالاكسجين غير ضرورى ويسبب كذلك ضياع للطاقة. الحد الحرج للاكسجين CDO فى المراحل المختلفة لنمو بكتريا Bt ثم تقديرها بشكل حركى (اشكال ٦-٢٣ ، ٦-٢٤). فى هذا البحث قام الباحثين بالحساب تبعا للقيمة الحرجة لتركيز الاكسجين (شكل ٦-٢٤). خلال مراحل النمو المبكرة والمتاخرة تستهلك بكتريا Bt اكسجين اقل. القيم الحرجة لتركيز الاكسجين بعد ٤ ، ٢٢ ساعة من التخمر كانت ١٣,٢% ، ١٣,٠% على التوالى. خلال المرحلة اللوغاريتمية خاصة فى نهايتها يصل الحد الحرج CDO الى القيمة ٢٥,٢% ويصل معدل امتصاص الاكسجين ٢٧,٨% مول/دقيقة. لقد اتضح ان المرحلة اللوغاريتمية هى المفتاح المحدد لامداد الاكسجين.

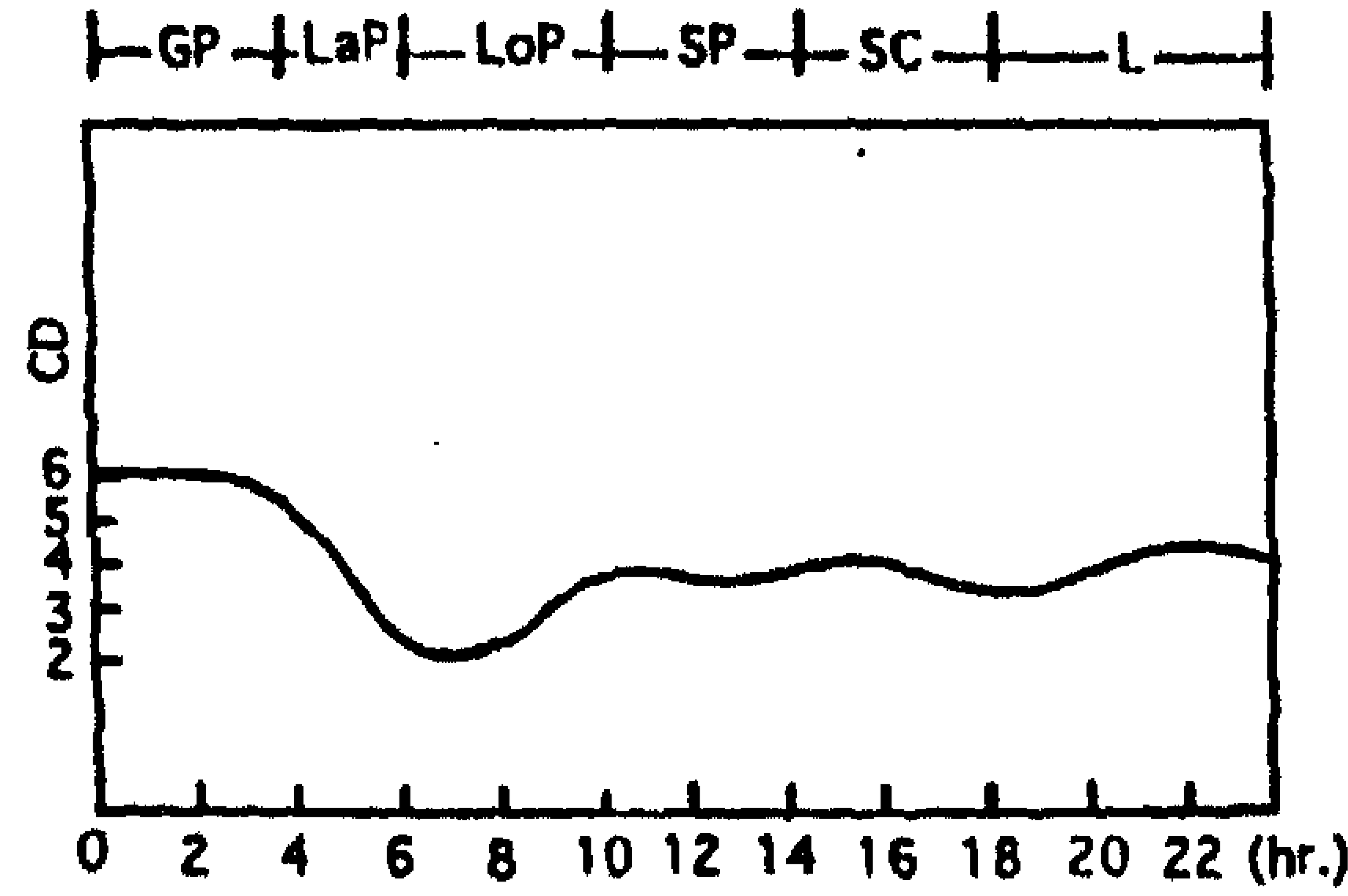


Figure 5. The patterns of viscosity curve.

GP = Germination Phase	LaP = Lag Phase	LoP = Log Phase
SP = Stationery Phase	SC = Sporulation Cell	L = Lysis

شكل (٦-٢٢): الاكسجين المذاب الحرج

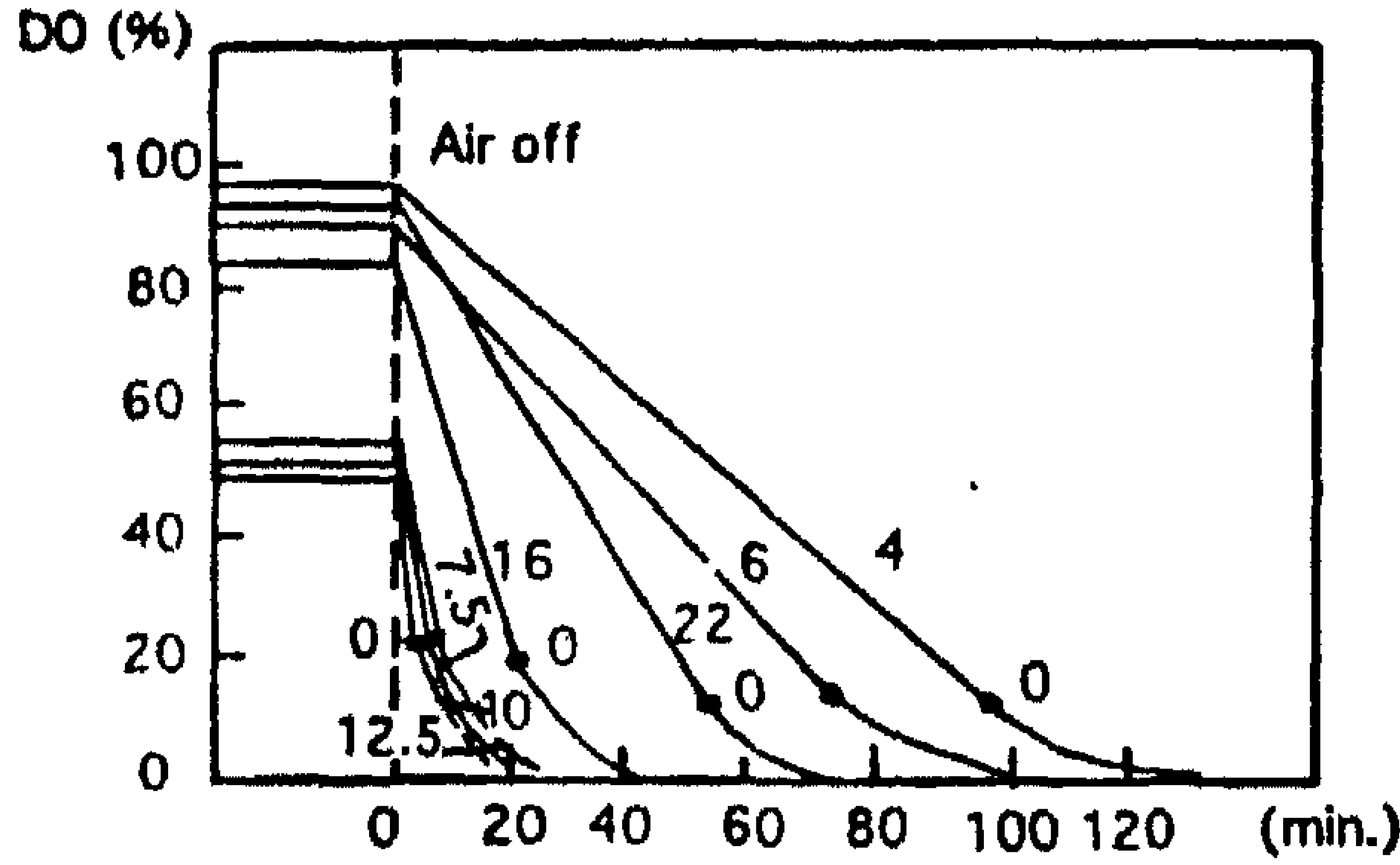
٢- نظم منحنيات الاكسجين المذاب DO فى الاوساط مختلفة التركيز

يتم دمج استهلاك مصادر الكربون مع امتصاص الاكسجين نفس الوقت لخلق الاديونوزين . اظهر منحنى الطاقة ATP ان الهدم Catabolism يمثل نظام التمثيل الكبرى قبل ٨ ساعات وكانت معدلات بناء الاديونوزين تراى فوسفات ATP اكبر عن الاستهلاك. لقد زاد محتوى ATP بالتدريج ووصل للقيمة بعد ٨ ساعات. خلال المرحلة اللوغارتمية تتكاثر الخلايا الخضرية بشكل اسى مع زيادة التخليق الحيوى. لقد كان معدل الاستهلاك سريعا بشكل واضح عن معدل بناء الطاقة ATP. لقد نقص التراكم بشكل حاد. فى نهاية المرحلة اللوغاريتمية يتوقف النمو ويزداد محتوى ATP فى الحال. خلال تكوين الجراثيم والبللورات يظل موجودا بعض حالات استهلاك الطاقة لخفض منحنى ATP.

٣- اللزوجة Viscosity:

لقد تم قياس لزوجة البيئة والنتائج مدونة فى الشكل (٦-٢٢). بعد اربعة ساعات تخرج الخلايا المنبتة انزيمات لتحويل النشا الى تحت وحدات. تناقصت اللزوجة بسرعة.

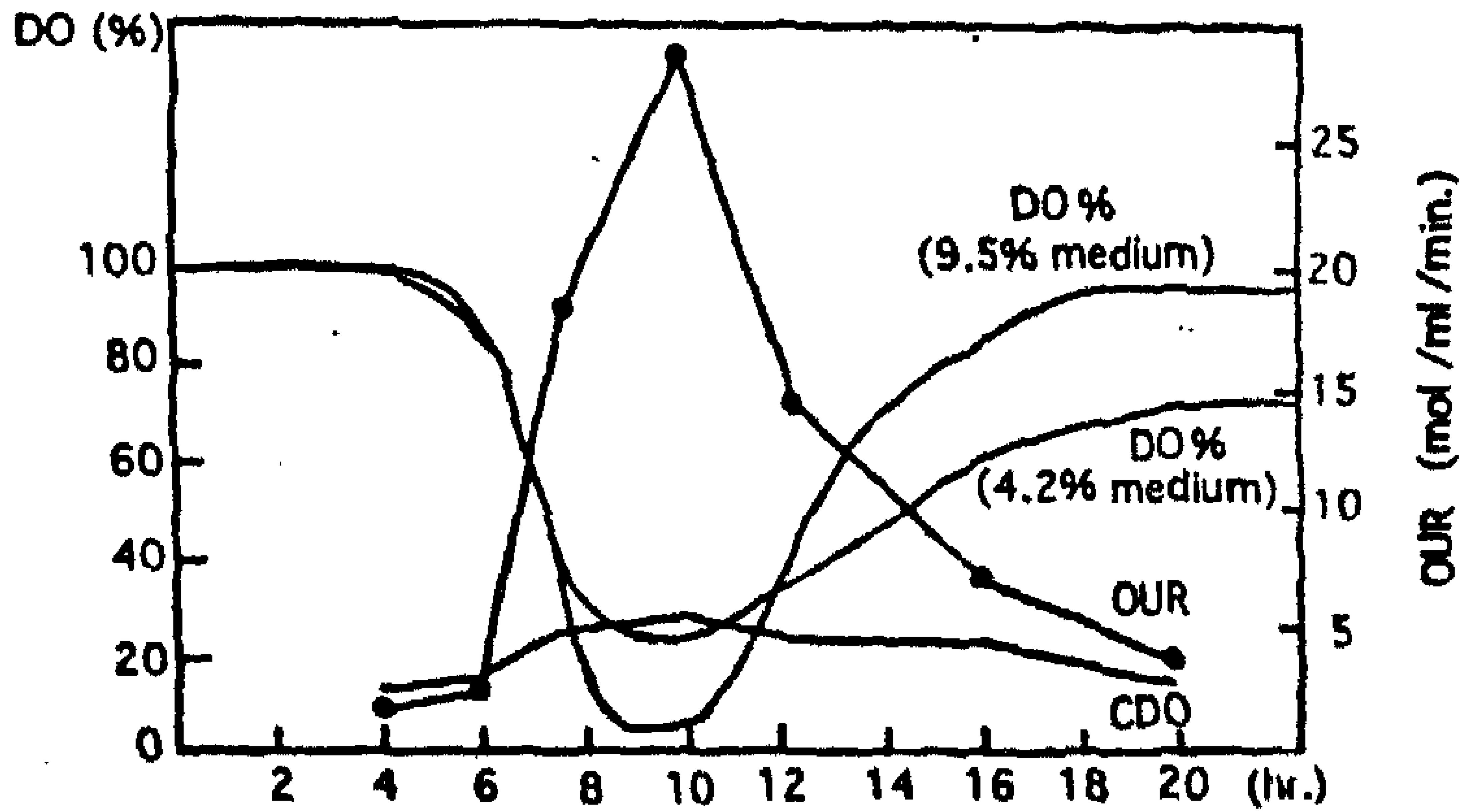
خـــلال المـــرحلة الثابتة lag تزداد اللزوجة مع زيادة مجموع الخلايا وتظل ثابتة نسبيا فى المـــراحل الاخـــيرة. لقـــد ذكر ان الخلايا الخضراء تحتاج كمية كبيرة من الاكسجين فى المرحلة اللوغاريتمية ولكن زيادة اللزوجة حفزت من مقارنة نقل الاكسجين ومن ثم خلقت صعوبة اكثر فى الامداد بالاكسجين.



شكل (٦-٢٣): نظم منحنى اللزوجة

خلاصـــة القـــول انـــه مـــن الممكن استخدام تقدير محتوى الحمض النووى لمعرفة مجموع الخلايا وهذا يحقق الاستفادة من السرعة والسهولة والدقة حيث يمكن الاستفادة من تقديـــر الحمض النووى للتحليل المتوسط لعملية التخمر. خلال المرحلة اللوغاريتمية تكون كل عمليات التمثيل فى غاية النشاط. وهو يعتبر المرحلة المحددة لتحسين مستوى التخمر. ان ضـــبط تمثـــيل الكربوهـــيدرات اجـــرى اساسا فى هذة المرحلة. يجب تعضيد الامداد بالاكســـجين. يجـــب اجـــراء مزيد من البحوث لمعرفة دور DP. التخليق الحيوى الكثيف لـــبللورات البروتيـــن تعتبر الهدف النهائى لتخمر بكتريا Bt. العلاقات المتداخلة الواضحة بيـــن التغذية بالنتروجين والبروتييز والبللورات قد تكون اساس السمية العالية للتخمر. لذلك يجـــب تعطيـــن تمثـــيل النتروجين خاصـــة من الوسط الثابت وحتى مرحلة التجرثم. ترى فوســـفات ATP ونـــاتج التمثـــيل الوسطى لتكوين وبناء الخلايا. البيئة عالية التركيز عادة تحـــتوى علـــى جـــزء كبير من مصادر الكربون والتى تسبب زيادة فى امتصاص معدل الاكســـجين. نظم منحنيات الاكسجين المذاب (DO) للبيئة مع تركيزين ٤,٢ ، ٩,٥% على الـــتوالى موضـــحة فى (الشكل ٦-٢٤). خلال مرحلة الانتاج لا يستهلك الاكسجين وتظل قـــيمة DO عـــند مستوى ١٠٠%. مع استمرار تكاثر خلايا B.t. يزداد معدل امتصاص

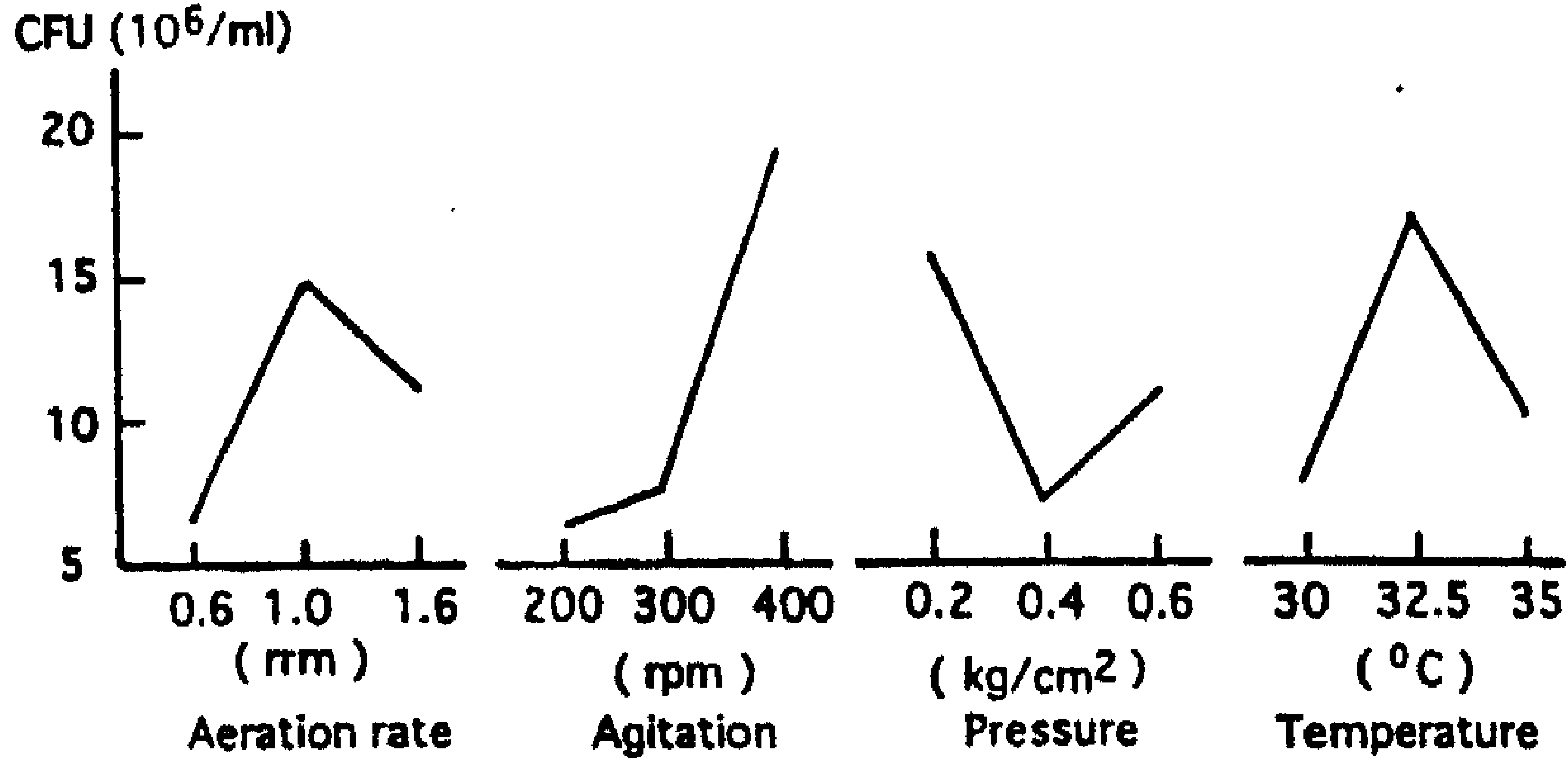
الاكســـجين ثــم تــبدأ منحنـــيات DO فى الانخفاض. خلال المرحلة اللوغاريتمية يحدث انخفاض حاد فى منحنيات D وكانت اقل قيمة فى البيئة ٤,٢% هى ٢٣% وهى قريبة من الحــد الحـــرج للاكسجســن المذاب CDO. اقل قيمة مع وسط تركيز ٩,٥% كانت ٥% والاقل منها تحدث القيمة الحرجة لتركيز الاكسجين لمدة ٣,٦ ساعة. من الواضح ان نقص الاكســـجين خلال المرحلة اللوغاريتمية كان كبيرا جدا مع استخدام بيئة ذات تركيز عالى. فى مرحلة تكوين الجراثيم والبللورات يتناقص معدل امتصاص الاكسجين وترتفع منحنيات DO فى الوسطين بسرعة.



شكل (٦-٢٤): نظم مستوي CDO ومنحنيات DO في لبيئة ذات التركيزات المختلفة

٤ــ تحسين امداد DO لزيادة مستوى التخمر:

لتحســـين المزيد بالاكسجين باستخدام بيئة ذات تركيز عالى تمت دراسة دور اربعة عوامـــل مؤثـــرة هـــي ســـرعة الرج والتقليب ، معدل التهوية ، درجة الحرارة ، الضغط بواســـطة اختبار التعامد Orthogonal. العدد الحيوى او معيار الحيوية استخدام بشكل غير مباشـــر لمعرفة مدى تحسين الاكسجين المذاب DO. العلاقة بين الحيوية وكل من العوامل الاربعـــة موضـــحة فـــى الشكل (٦-٢٥). يتضح من الشكل ان الحيوية تتاثر بشكل كبير بعامل سرعة الرج ومن ثم يكون هذا العمال الاكثر اهمية مع DO.



شكل (٦-٢٥): العلاقة بين CFU وكل من العوامل المدروسة

نظم منحنيات الاكسجين المذاب DO مع سرعات التقليب والرج موضحة فى الشكل (٦-٢٦). مع زيادة سرعة الرج والتقليب ارتفعت القيمة الاقل من منحنيات (DO). الفترة لمـــا تحـــت معدل الاكسجين المذاب الحرج قصرت. مع سرعة تقليب ٣٠٠ لفة فى الدقيقة rpm ، ٤٠٠ ، ٥٠٠ خلال عملية التخمر كانت اقل قيمة DO ٥% ، ١٨% ، ٢٥% على الـــتوالى. عندما زادت سرعة التقليب عن ٥٠٠ لفة/دقيقة كان منحنى DO اعلى من القيمة الحـــرجة لتركيز الاكسجين مما يوضح ان امداد الاكسجين كان كافيا. رفع سرعة التقليب زاد من تركيز الاكسجين المذاب. عد الخلايا الحية مع سرعات التقليب المختلفة تم تقديرها والنـــتائج مدونة فى الشكل (٦-٢٧) مع ارتفاع سرعة التقليب زادت عدد الخلايا الحية كما زاد معـــدل استخدام السكر الكلى كذلك. لقد اتضح ان رفع سرعة التقليب زادت من تركيز DO ممـــا ادى الى تحفيز عدد الخلايا الحية. لكن تاثير المناطق المختلفة وسرعة التقليب علـــى مســـتوى التخمر تباينت بشكل معنوى. عندما ارتفعت سرعة التقليب من ٣٠٠ الى ٤٠٠ لفة فى الدقيقة زادت حيوية واعداد الخلايا بمقدار ٧,٤٧% بينما وصلت الى ٣١,٤ ، ٤,٢% عندما زادت الخلايا الحية من ٤٠٠ الى ٥٠٠ لفة / دقيقة ومن ٥٠٠ الى ٦٠٠ لفة فـــى الدقيقة على التوالى. لقد تاكد ان سرعة الرج من ٤٠٠ الى ٥٠٠ لفة فى الدقية تعتبر المنطقة الافضل. الامداد الزائد للاكسجين اظهر تاثير قليل على تحفيز عدد الخلايا الحية.

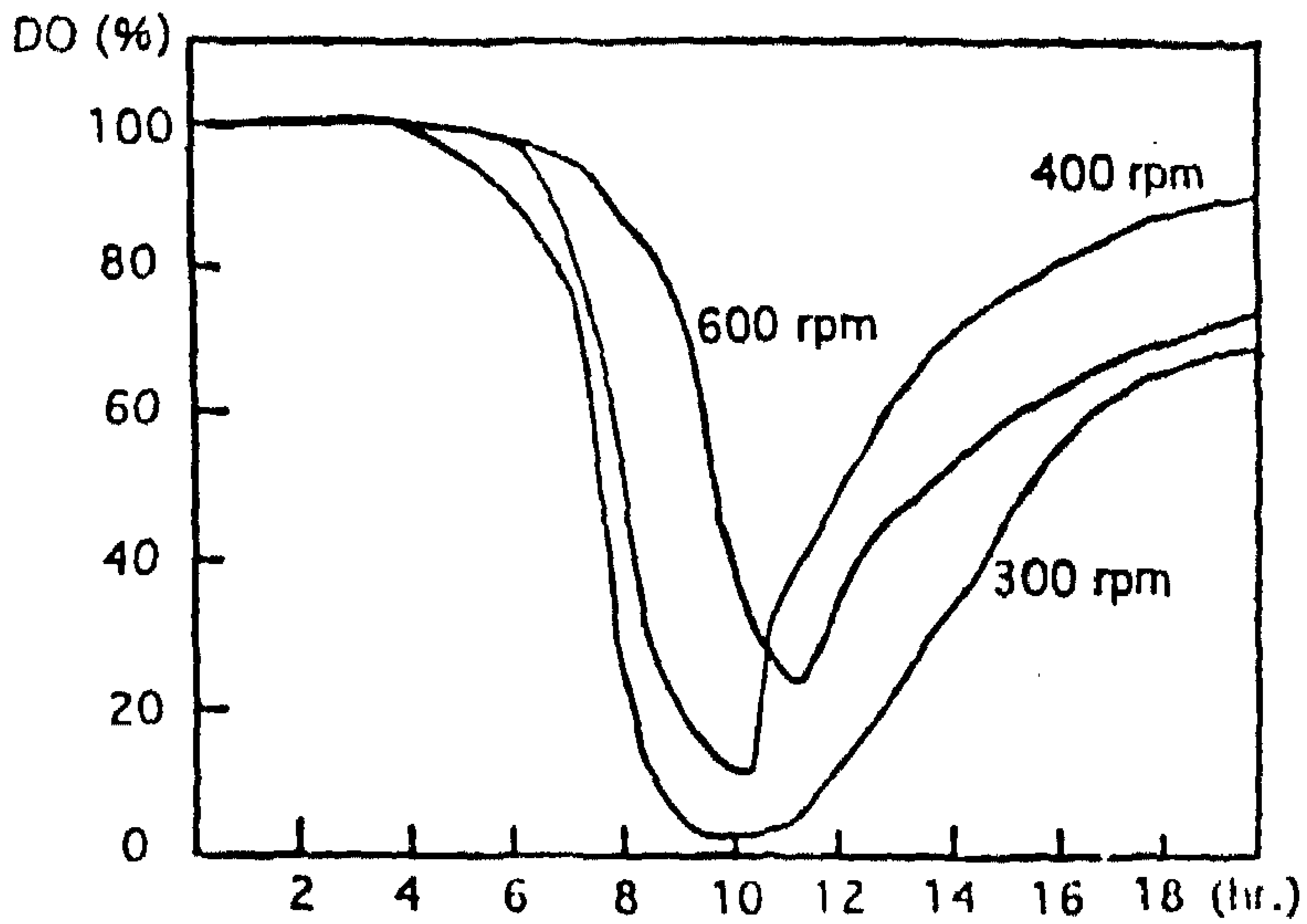
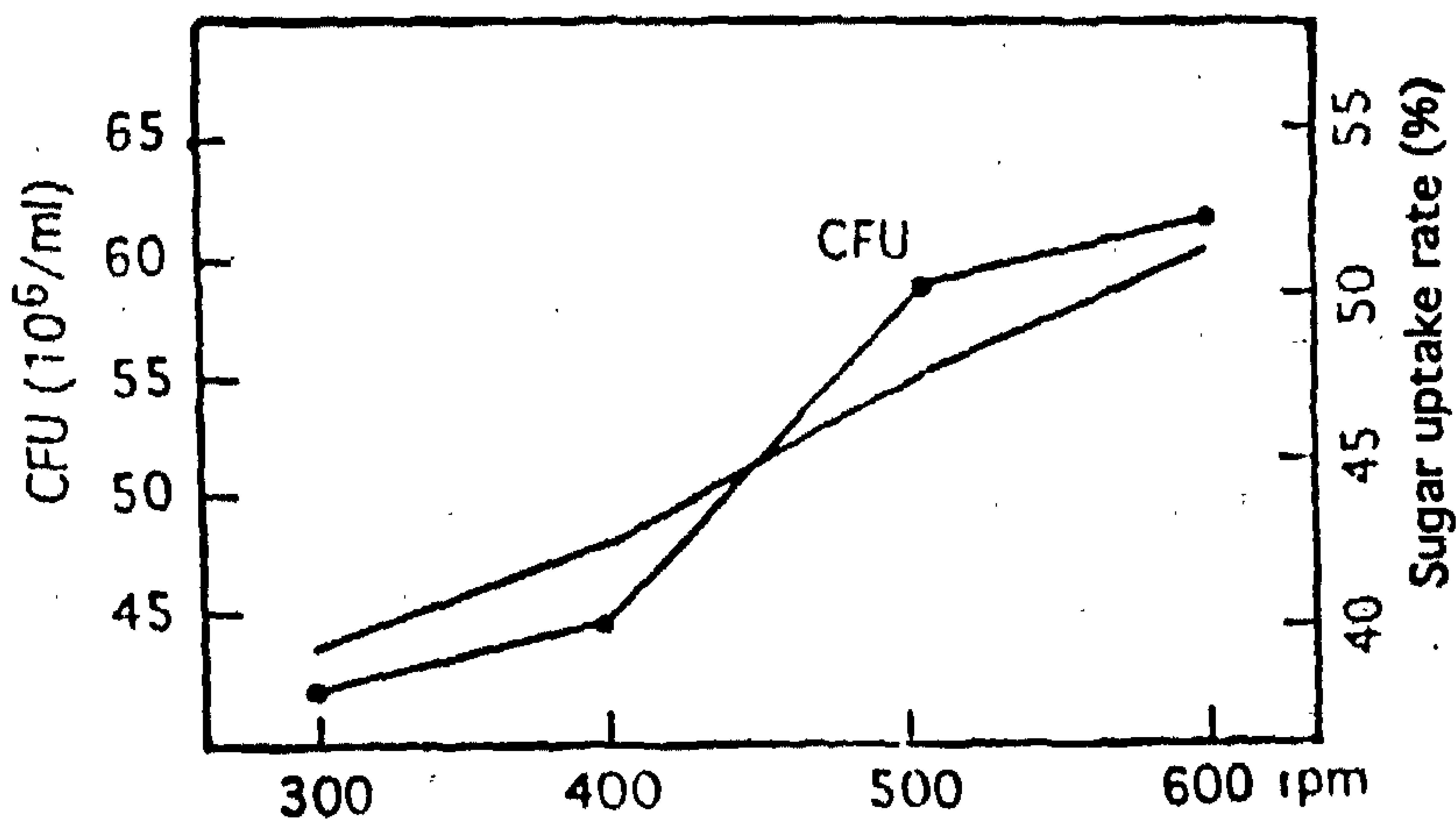


Figure 4. The patterns of DO curves of different agitation speed.



شكل (٦-٢٧) : العلاقة بين CFU ومعدل استهلاك السكر مع سرعات تقليب مختلفة.

ثانى عشر: انتاج واستخدام الباسيلليس ثورينجنسيز فى وقاية المزروعات فى البرازيل

مـــن مقالـــة للباحث I.D-Moraes بقسم هندسة وتكنولوجيا الغذاء / UNESP – الـــبرازيل. لقد قدمت بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز فى البرازيل لاول مرة عام ١٩٦٠ فى المعهـــد الـــزراعى بكابيناس (IAC) وهو المعمل المركزى ولكن الوضع التقنى والفنى لم يكـــن كافـــيا لتحفـــيز وتعقيد استخدامها حيث لم يستطع الفلاحين فهم الاختلاف الكبير بين الميـــيدات الحشـــرية الكيميائية والحيوية ونواحى الاختلاف فى الفعل والفاعلية. لقد حدث تشـــوش فـــى فهـــم الموضوع لان المبيدات الكيميائية التقليدية تقتل الحشرات بسرعة وفى الحـــال على عكس المبيدات الحيوية. فى ذلك الوقت لم تكن المشاكل الناجحة عن الافراط والخطـــأ فـــى استخدام المبيدات الكيميائية قد نوقشت بعد مقارنة بما يحدث الان حيث تبذل جهـــود كبيرة فى البرازيل لتقليل والسيطرة على مستوى التلوث وكذلك تشجيع اللجوء الى المبـــيدات الكيميائـــية داخل اطار وبرامج المكافحة المتكاملة. مع زيادة اهتمام العامة عن الامان البيئى قام العديد من البحاث والجماعات باقتراح دراسات تحقق بيئة افضل فى العام الـــتالى انعقـــد المؤتمر العالمى للبيئة فى البرازيل عام ١٩٩٢ وفية تم القرار باهمية ادارة الملوثـــات والتى يمثل استخدام وانتاج المبيدات الحيوية النصيب الاساسى. منذ ١٩٩٠ كان بـــيع المبيدات الحشرية يحتاج الى روشتة زراعية تصدر من مهندس الزراعة او مهندس الغابـــات وكـــان ذلـــك صريحا فى التشريعات من خلال القانون ٧٨٠٢/٩٠ وهو القانون الـــبرازيلى الخـــاص بالتعامل مع السموم الزراعية. لقد قامت العديد من الشركات العالمية الكـــبرى ســـواء منفردة او بالمشاركة مع الصناعات البرازيلية دراسات خاصة بامكانيات الانـــتاج الموسع للمبيدات الحيوية الحشرية. بين المشاكل التى واجهت هذا التوجة هو حجم الســـوق وهـــو لـــيس بالكبر بحيث يشجع على انشاء مصنع يعمل فقط على انتاج بكتريا الباســـيلليس B.t. المنتجات التى بيعت فى البرازيل كانت مستوردة وتسوق بواسطة شركة مرك شارب دوم (ديبيل من معامل ابوت فى امريكا) وساندوز (ثوروسيد). فى السبعينات قامـــت شـــركة Rhodia بتسويق مستحضر الباسيلليس باكتوسبين من رون بولانك. هذة مبـــيدات حشـــرية ضد حشرات حرشفية الاجنحة ولكن فى السنوات الاخيرة وبعد اكتشاف الســـلالة اسرائيلينســـيز الفعالـــة ضد يرقات البعوض ادت الى قيام بعض المعاهد البحثية البرازيلـــية بعمـــل محـــاولات لـــتطوير هذا المنتج ضد بعوض الايدس والكيوليكس. لقد استهدفت شركات سيبا-جايجى وشل انذاك انتاج البكتريا فى البرازيل.

بحوث بكتريا B.t. فى البرازيل:

عـــام ١٩٧٠ بدأت مجموعة من الباحثين فى قسم الهندسة الغذائية بجامعة كامبيناس بدراســة هذا النوع من المبيدات الحشرية البكتيرية التى تنتج فى عمليات التخمر المغمور. مــن ١٩٧٠ وحتى ١٩٧٦ تم حصول على درجتان علميتان احدهما للماجستير والاخرى للدكــتوراه وثــم الحصـــول على براءة اكتشاف وحقوق ملكية لعملية انتاج الباسيلليس فى الـــبرازيل لقـــد كانـــت هـــذة الدراسات تركز على انتاج الاندوتوكسين عن طريق تخمر التحضـــيرة وكانت البيئة تتكون من مولاس قصب السكر (١٠جم/لتر) والذرة (٢٥جم/لتر) مـــع استخدام وحدة تجهيز صغيرة من ١-٢٠ لتر. اجريت بعض التجارب فى مخمر سعة ٢٥٠ لـــتر باســـتخدام البيـــئة حيـــث درست انسب ظروف التهوية والتقليب للوقوف على محددات عملية التخمر. لقد كانت تكاليف مصادر الكربون والنتروجين والاحماض الامينية والفيتاميـــنات قلـــيلة كمـــا كانت متوفرة فى البرازيل فى الفترة من ١٩٧٦ وحتى ١٩٨١ تحولـــت الدراســـات فى اتجاه التوكسين الخارجى extended وحصل البحاث على جائزة محلية عام ١٩٨٥. خلال نفس الفترة تم انهاء دراسات عن تاثير معدلات التهوية والتقليب على البكتريا وانتاج المركب وكذلك عن عملية التخمر المستمرة (١٩٨٢). لتقليل التكاليف قـــام الـــبحاث بدراســـة انـــواع مختلفة من المواد الخام خاصة بقايا المواد الغذائية المائية والمشـــروبات الاخرى ومخلفات الصناعة. منذ ١٩٨٩ دخلت جامعات ومعاهد اخرى فى البرازيل فى الدراسات مثل جامعة UNESP بتعضيد من هيئات محلية وعالمية كثيرة.

استخدامات بكتريا Bt:

لقـــد تم نشر العديد من المقالات عن استخدامات بكتريا Bt والسلالة الاسرائلية. لقد استخدمت المنتجات المستوردة بسبب عدم وجود انتاج محلى. البحاث يستطيعون انتاج هذة الســـلالات فـــى المعمـــل على مستوى صغير فى القلابات ووحدات التخمر الصغيرة لقد صـــادف الـــبحاث مشاكل عديدية عند محاولة الانتاج على مستوى كبير تجارى خاصة ما يـــتعلق باختبارات الجودة والقياسية وتجهيز المستحضرات والتسجيل/التداول وكذلك النسبة بين التكاليف / الفوائد.

References

Benetoli, I. ; Donaires, F.S. ; Yamamoto, P.T. and Gravene, S. (1991). Biological control of soybean catterpillar Anticarsia gemmatalis, with Bacillus thuringiensis and influence against natural enemies. XIII Cong. Bras. Ento. Recife, Brazil. Abstracts.

Capalbo, D.M. (1982). A contribution to the study of continuos fermentation of Bacillus thuringiensis M.Sc. thesis, 81 pp. UNICAMP. Brazil (Advisor MORAES, I.O.).

Capalbo, D.M. and Moraes, I.O. (1984). Study of continuous fermentation for obtaining bacterial insecticide to control agricultural pests. IV Japan Brazil Symposium on Science and Technology. V. 2, 248-255.

Gravena, S. ; Sanguino, J.R. (1980). Biological control of the sugar cane borer Diatraea saccharalis using egg predators and Bacillus thuringiensis, Proc. Entom. Soc. Brazil. 9 (1), 87-95.

Gravena, S. et al, (1983). Cotton integrated pest management strategies in Jaboticabal-SP, with Bacillus thuringiensis and beneficid arthropods. Proc. Ent. Soc. Brazil, 12 (1), 17-29.

Moraes, I.O. ; Capalbo, D.M. and Moraes, R.O. (1990). Bacterial insecticide production by Bacillus thuringiensis in : food biotechnology. 4 (1), 282.

Moscardi, F. ; Gomes, D.R. and Morales, L. (1991). Field evaluation of Bacillus thuringiensis isolates fo control of the velvet been caterpillar (VBC) in soybean and their relative virulence to VBC and to the soybean looper under laboratory conditions. XII Intern. Plant Protection Congress. Rio de Janeiro. Brazil. Abstracts.

Villani, H.C. ; Campos, A.R. and Gravena, S. (1980). Efficiency of Bacillus thuringiensis and phenitrothion plus phenvalerate to control dione juno in passion flower. Proc. Entom. Soc. Brazil., 9 (2), 255-260.

ثالث عشر: الباسيلليس ثورينجنسيز والامان البيئى:

من مقالة للدكتور مطر بالمركز القومي للبحوث – مصر حيث قدم للمقالة بالقول ان التلوث الزائد للبيئة والمخلفات السامة ومشاكل تطور المقاومة في الافات وسرطانية المبيدات الحشرية الكيميائية ادت الى تحفيز العديد من البحاث نحو ايجاد بدائل جديدة اكثر امانا وحدث نفس الشئ مع الصناعة. الممرضات الحشرية وما تتمتع به من تخصصية نسبية جذبت انتباه العديد من الباحثين منذ حقب عديدة من الزمان. لقد اعتبرت بكتريا باسيلليس ثورينجنسيز من الممرضات الفعالة ضد العديد من الافات الحشرية التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة. لقد كان هناك تخوف من احتمالات حدوث انتخاب لهذة الممرضات الحشرية بطريقة او باخري بحيث قد تتحول الى ممرضات للفقاريات. فى عام (١٩٥٨) اعلن الباحث براون ومعاونوه ان سلالات بكتريا .B.t لا يمكن ان تتحول لتصبح ممرضة للفقاريات. قبل تصنيع وادخال هذة الوسيلة الحيوية فى مختلف برامج المكافحة يجب اجراء دراسات مكثفة عن الامان الحيوى والبيئى وفى هذا المقام سوف نشير الى ماحدث فى بعض الدول. لقد صممت دراسات الامان لتحوير درجة امان Bt على اللافقاريات النافعة والفقاريات (الطيور – الحيوانات – الانسان) والنباتات كذلك نشرت دلائل لتقييم امان الوسائل البكتيرية بواسطة هيئة الصحة العالمية WHO.

تقييم السمية على الانسان:

من المعروف ان سلالات بكتريا Bt تنتج سموم عديدة. لقد تم تقييم الفعل السام لكل سلالة باستخدام بروتوكولات الاختبارات التقليدية المتعارف عليها على الجرذان والفئران والارانب وخنازير غينيا وغيرها. لقد اعطيت الحيوانات جرعات عالية كانت تتراوح من متوسط الجرعة الحقلية ومضاعفاتها حتى ١٠٠ مرة اعلى. لقد كانت طرق المعاملة عن طريق الفم والحقن البرتيوني وتحت الجلد وعن طريق الاستنشاق والتعرض القمي او المعاملة الجلدية. فى حالة تقييم السمية الحادة كانت تعطىالجرعة مرة واحدة متبوعة بفترات ملاحظة تختلف فى الطول بناء على نوع الاختبار. المعاملة على المدى الطويل (٢ اسبوع وحتى ٦ شهور) للجرعات تحت القاتلة استخدمت لتقييم السمية المزمنة. حديثا اجريت دراسات عن التاثيرات الفسيولوجية والهستوباثولوجية فى داخل وخارج جسم الحيوانات مع فحص قطاعات دقيقة من الاعضاء المختلفة للوقوف على تاثير التوكسينات على العمليات الفسيولوجية المختلفة والوظائف الخلوية للحيوانات.

التاثير على الفقاريات:

لــم يشير البحاث فيشر وروزنر (١٩٥٩) ، براون ومعاونوه (١٩٥٨) وغيرهم الى اى دليل عن الطبيعة المعدية لمستحضرات بكتريا Bt على الثدييات والطيور سواء اعطيت عن طريق الفم او من خلال الحقن البريتونى. جراثيم البكتريا ظلت حيه فى براز حيوانات التجارب. الجرعات العالية تحفز المرضية البكتيرية Bacterimia والتى اختفت بعد ٢-٤ ايــام مــن المعاملة. لقد لاحظ Godavaribi واخرون (١٩٦٢) عدم حدوث ايه تغيرات مرضـــية او عـــدوى موضـــعية فـــى الكبد والكلى وانسجة الطحال فى الفئران التى سبق معاملــتها عن طريق الفم منذ ثلاثة شهور بجرعات عالية من جراثيم Bt. لقد اشار لامانا وجونــز (١٩٦٣) ان جراثــيم مــزرعة نمو Bt كان ١٠٠ مرة اكثر سمية عن مزرعة التجرثم. لقد سجلت ملاحظات مختلفة على الطيور والتى عوملت لفترات طويلة (٢٨-٧٠ يــوم) بجرعات يومية من Bt تتراوح من ٠,٢-٥٧٠×١٠^٧ جراثيم/طائر (فيشر وروزنر ١٩٥٩). لقــد اشــار الباحث Ignoffo (١٩٧٣) بعدم حدوث ايه تاثيرات معاكسة عندما استخدمت تجهيزات خالية من التوكسين الخارجى بينما حدث فقد الوزن وخفض فى الغذاء المســتهلك عندما عوملت الطيور بالبيتا-اكسوتوكسينات لبكتريا Bt. كذلك اجريت تجارب علـــى متطوعين ادميين فقد اثار الباحث Rosner (١٩٥٩) ان كل متطوع استنشق ١٠٠ مللجــرام مــن المســحوق يوميا على امتداد خمسة ايام. بعد ٤-٥ اسابيع تم اعادة فحص المتطوعيـــن ووجدوا اصحاء وكانت كل الاختبارات المكثفة فى المعمل اسفرت عن نتائج سالبة. لقد تم اختبار السمية الحادة والفمية للثوروسيد (B.t.) على صورة معلقات (٣٣%). لقــد وضـــعت جرعات حتى ٢٤جم من الثوروسيد مباشرة فى معدة الفئران. لم تحدث ايه وفيات او اعراض سمية حتى اسبوع من المعاملة.

فى العقد الاخير اجريت دراسة مرضية شاملة وقد اظهرت النتائج نفس الاستنتاجات الســـابقة. فى اليابان وجد Nishiitsutsuji ان الاندوتوكسين البللورى لبكتريا Bt ليس له تاثــيرات ســـامة على الخلايا Cytotoxic حتى على المستوى التراكيب الدقيقة وكذلك لم تحـــدث ايـــه تغـــيرات مورثولوجـــية او تثبيط نمو على خلايا الثدييات. هذا على عكس التاثـــيرات التقلـــيدية علـــى خلايا الحشرات (انتفاخ وانفجار للخلايا الطلائية العمادية التى تبطـــن المعدة الوسطى). لقد لاحظ ثوماس وايلد (١٩٨٣) ان البللورات القابلة للذوبان فى القلويـــة للبكتريا B.t من الصنف كورستاكى لم تظهر ايه تاثيرات سامة فى داخل وخارج الجســـم مـــن الـــنواحى المرضـــية التشـــريحية او اى نشاط لتحليل خلايا الدم فى الفئران

والجــرذان والاحصــنة والغــنم والانســان فيما يتعلق بكرات الدم. من جهة اخرى فان التوكســينات الخارجــية الموجودة فى رائق مزارع النمو لنفس سلالات بكتريا Bt سببت بعــض التغيرات المرضية فى خلايا الثدييات عندما عوملت فى الحيوانات بجرعات عالية ولمــدة طويلــة. لقد وجد Meretoja واخرون (١٩٧٧) ان التركيزات السامة للتوكسينات الخارجــية تحفز زيادة معنوية وكبيرة فى حدوث التغيرات الكروموسومية بينما التركيزات الواطــية لم تؤثر على انقسام الدم للحيوانات المعاملة. التجارب التى اجريت بواسطة نفس المؤلفيــن فى داخل جسم الحيوانات اظهرت تاثير Clastogenic فقط عندما تم احلال ماء الشــرب للحيوان بمقدار ٥٠ ، ١٠٠% من المركب المختبر على امتداد ثلاثة شهور عندما اعطيــت الفئران جرعات قاتلة من الطرز السيرولوجى I (الرائق). وجد كذلك ان المعاملة بــرائق الطرز الوراثى (٣) احدثت تاثير اورام قليلة. فى عام ١٩٧٩ وجد Kahkonen واخرون ان بعض التاثيرات المرضية (التاثيرات الميتوزية – ٢) لوحظت فى الخلايا فى حــيوانات الاختبار عندما عوملت بجرعات عالية من البيتا اكسوتوكسين للبكتريا Bt بينما الــتعرض لجــرعات حقلــية لم تجرى تقييم للتاثيرات الطفرية او الاورام. لقد استنتج ان اخطـــار الــتلف الخلوى الوراثى Cytiogenetic damage للانسان التى تسببت بواسطة الاكسوتوكســين فى الكميات التى استخدمت فى مكافحة الافات الحشرية ليست ذات معنى اى يمكن تجاهلها. كذلك فان مزرعة بعض سلالات .B.t اثرت على ارتباط الكالين فوسفو داى استريز I مع غشاء بلازما للامعاء والبنكرياس. لقد اشار تاجوشى واخرون (١٩٨٥) ان الالكاليــن فوسفاتيز فى وجود التوكسين قد تحرر بكميات معنوية كبيرة عما هو لحال مــع المقارنـــة ولكــن دون تحلل الخلايا. لقد اظهرت معظم دراسات الامان الحيوي التى ذكـــرت سابقا ان التوكسينات الخارجية كانت امنة بما فيه الكفاية اذا استخدمت بالتركيزات الحقلــية الموصــى بهــا وكذلــك فـــان معظــم المصانع تجابه الان تقييد فى جودة انتاج المستحضـــرات الــتجارية بحيث تكون خالية من التوكسينات الخارجية لبكتريا Bt. الرائق المحــتوى علـــى توكسينات غير مرغوبة استبعد ويتم التخلص منه نهائيا. بعض اصناف البكتريا .B.t ليست منتجة للتوكسينات الخارجية مثل الصنف كورستاكى ومن ثم تكون فى منــتهى الجــذب لرجالات الصناعة. لقد حدث تقدم حديث فى المكافحة ببكتريا Bt وكذلك تقـــدم مذهــل فـــى تكنولوجيا نقل الجينات بما يضمن بادخال المركب السام الفعال للدلتا– اندوتوكسين للبكتريا Bt الى البيئة.

التاثير على الحشرات النافعة: فينما يتعلق بالتاثير على نحل العسل اشار الباحثان Krieg and Henfs (١٩٦٣) ان تجهيزات الجراثيم والبللورات كانت عديمة الضررعلى نحل العسل مع الجرعات الموصى بها بينما رائق بكتريا Bt ثورينجنسيز كانت عالية السمية لشغالات النحل. لقد ذكر Krieg (١٩٦٤) ان التركيزات الموصى بها من B.t. فى العمليات الزراعية ليست ضارة على شغالات النحل. بالنسبة للتوكسين الخارجى ذكر كيريج (١٩٦٧) ان معدل الجرعات العادية فى التطبيقات الحقلية كانت سامة على نحل العسل.

بالنسبة للتاثير على الاعداد الطبيعية تاكدت ادلة عن الامان على العديد من الاكاروسات المفترسة والحشرات الملتهمة (سلامة واخرون ١٩٨٢ و١٩٨٥، البنهاوى ومطر ١٩٨٦). فى بعض الحالات تاثرت بعض النواحى الحيوية (طول الدوام ، خفض مقدرة التغذية، نقص بسيط فى الخصوبة) بدرجة بسيطة من جراء المعاملة ببكتريا Bt. لقد اشار Dirimanerv واخرون (١٩٨٠) انه عند استخدام Bt مع الترايكو ما حدث نقص كبير فى الضرر الذى تحدثة الفراشة الفجرية وصل الى ٤% فقط عند الحصاد. المبيدات الكيميائية تقلل من التلف حتى ١% ولكن خفض المعاملات بالمبيدات احدث زيادة كبيرة فى كثافة المفترسات سيرفدى ، كريزوبيدى ، الاكاروس المفترس وابى العيد وغيرها. لقد فكر مارشالى (١٩٧٥ أ،ب) ان الطفيل قد يكون له تاثير معاكس على الممرض والعكس صحيح (خفض كمية الغذاء التى تؤخذ بواسطة العائل قد تخفض من الجرعة الفعالة بينما موت اليرقات بسبب الممرض قد تقتل الطفيل). لقد حدثت تاثيرات تنشيطية عندما استخدمت Bt بجرعات منخفضة تسمح بوقت كافى للطفيل كى ينتج قبل موت العائل. لقد تم تقييم التاثيرات التنشيطية بين الطفيل وبكتريا Bt فى التجارب الحقلية بواسطة Sneh (١٩٨٣). لقد وجد سلامة وزكى (١٩٨٥) عدم حدوث تاثيرات ضارة فى تطور الاطوار غير الناضجة للطفيل T.evanescens او النسبة المئوية للخروج عندما استخدم الممرض على بيض العائل قبل وبعد التطفل. اخيرا وليس اخرا دعونا نتطلع للمساهمة فى خلق بيئة افضل خالية من اضرار المبيدات الحشرية وما يستتبعها من تلوث. لقد جاء الوقت لبكتريا Bt وغيرها من الوسائل الحيوية الامنة كى تاخذ نصيبها فى مكافحة الافات فى ظل تسجيلات حقيقية وتوصيات فعالة.

REFERENCES

Brown, e.r.;Mady, M.D.; Treece, E.L. and Smith, C.W. (1958). Differential diagnosis of Bacillus cereus, Bacillus anthracis and Bacillus cereus var mycoides. J. Bacteriol, 75, 499-509.

Dirimanov, M.;Angelova, R. and Sabrikova, T. (1980). State of the harmful entomo and acarofauna and predacious species of insects in apple orchards with some plant protection technologies. Nauchni trudova, ent. Microbiol. Fitopathol. 25 : 15-30.

El-Banhawy, E.M. and Matter, M.M. (1986). Reaction of the predaceous mite Amblyseus gossipi to three varieties of Bacillus thuringinsis under laboratory conditions. Bull. fac. Of agric. Univ. of cairo 37, 1067-1077.

Fisher, R.A. and Rosner, L. (1959). Toxicology of the microbial insecticide thuricide. J. Agric. Ed., chem., 7, 636-688.

Grodavaribi (1962). Bacterial spores with malathion for controlling ephestia cautella. Pest technol. London 4, 155-158.

Ignoffo, C.M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N.Y. Academy of science, 217, 141-164.

Kahkonen, M. ; Gnipenberg, v. ; carllerg, g. ; meretoja, i. And sorga, m. (1979). Mutagenicity of Bacillus thuringinsis exotoxin 3 sister chromatoid exchange in rats in vivo. Hereditas 91, 1-4

Krieg, A. (1964). Uber die binenvertraglichkeit verschiedener industrie –preparate des Bacillus thuringinsis. Anz. Schadl-kde. 37. 39-40.

Krieg, a. (1967). Neues uber Bacillus thuringinsis und seine anwendug. Mitte. Biol. Bundesanatalt fur land und forstwirtschaft berline-dahlem heft 125, 106 pp.

Lammana, C. and Jones, L. (1963). Lethality for mice of vegetative and spore forms of Bacillus cereus and Bacillus cereus-like insect pathogens injected intraperitoneally and subcutaneously. J. Bacteriol 85, 532-535.

Marchal, S.D. (1975a). Role des laves entomophages dans I'infection a Bacillus thuringinsis des chenilles de "Pieris brassicae" L.

et "Anagasta kuekniella" zell. Rev. zool. Agr. Pathol. Vegetale 74, 68-84.

Marchal, S.D. (1975b). Development laravaire des hymenopteres parasites, apanteles glomeratus L. et phanerotoma flavitestacea F. chez des chenilles infectees par Bacillus thuringinsis berliner. Ann. Parasitologie. Humaine et comparee 50, 223-232.

Meretoja, T. ; Carlbeg, U. ; Linnainmera, K. and Sora, M. (1977). Mutagenicity of Bacillus thuringinsis exotoxin. Part 1. Mammalian test. Hereditas 85, 105-112.

Nakabayashi, T. and Ikezaiva, h. (1984). Release of alkaline phosphodiesterase from rat kidney by the specific phospholipase C of Bacillus thuringinsis cell struct. Funct. 9, 247-26.

Nishiitsutsuji-Uwo, J, ; Endo, Y. and Himeno, M. (1980). Effect of Bacillus thuringinsis delta-endotoxin on insect and mammalian cells. Appl. Entomol zool. 15, 133-139.

Salama, H. S. ; Zaki, F.N. and Sharaby, A. (1982). Effect of Bacillus thuringinsis Berl. On parasites and predators of the cotton leafworm spodoptera littoralis (Boised.). Z. ang. Ent. 94, 498-509.

Salama, H.S. and Zaki, F.N. (1985). Biological effects of Bacillus thuringinsis on the egg parasitoid trichogramma evanescens westw. Insect sci. applic., 6 (2), 145-148.

Sneh, B. ; Gross, S. and Gasith, A. (1983). Biological control of spodoptera littoralis (Boisd.) by Bacillus thuringinsis subsp. Entomocidus and bracon hebetor say (Hymenoptera, Brachonidae). Z., ang. Ent. 96, 408-412.

Teguchi, R. ; Asani, Y. and Ikezawa, H. (1985). Ectoenzyme release from rat liver and kidney by phosphatidylinostiol – specific phospholipase C. J. Biochem. (Tokyo) 97, 911-922.

Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983). Bacillus thuringinsis var. israelensis crystal delta-endotoxin effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo". J. Cell sci. 60, 181-189.

الباب السابع
إدارة المقاومة لتوكسينات باسيلليس ثورينجينسيز

مقدمـــة: حاجة الإنسان لمكافحة الحشرات قديمة قدم وجودة على وجه الأرض. الحشرات تزعج البشر من خلال العض والوخذ واعتراضها الطريق مما يزيد من استمرارية مطالبته بالمكافحـــة مـــن منطلق ان الحشرات تقوم بنشر الامراض للانسان مثل الملاريا والحمي الصـــفراء وكذلـــك زيـــادة الـــزراعة. مع زيادة تعداد سكان العالم زادت الحاجة لمجابهة الحشـــرات والســـيطرة على الفقد الذي تحدثه والذي يصل في المتوسط على مستوي العالم ٤٣% فـــي مقـــابل ١٣% على مستوي امريكا مع المحاصيل التى يستهلكها الانسان وهي قيمة عالية (Miller ١٩٩٨). لقد تغيرت محاولات الانسان في مكافحة الآفات من الطرق الطبيعـــية الى الكيميائيات المخلقة والان حدثت عودة الى الطرق الطبيعية مرة اخري. من حسن الطالع ان المبيدات الحشرية المخلقة الموجودة حاليا في الاسواق يفترض امانها وقلة ثباتها عن المركبات القديمة مثل الددت. التعرض طويل المدي للمبيدات المخلقة حديثا وجد مرتـــبط بحـــدوث الســـرطان وتلـــف الكبد والسمية المناعية وقصور المواليد علاوة على المشـــاكل التناســـلية والتكاثر في الانسان و الحيوانات (تيجلي ووايز ١٩٩٨). هذا يوضح اهمـــية تطوير الطرق الحيوية الطبيعية لمكافحة الحشرات أو ما يعرف بالمبيدات الحيوية وهـــذا هو الاتجاه الحالى. من اكثر المبيدات الحيوية انتشارا بكتريا باسيلليس ثورينجينسيز (B.t.) وهي تنتج بروتينات تبيد الحشرات خلال التجرثم. بكتريا التربه هذه وجدت بشيوع كبـــير في غبار الحبوب في الصوامع ومعدات تخزين الحبوب الاخري حيث اكتشفت لاول مـــرة فـــي الـــيابان ١٩٠١ بواســـطة الباحـــث Ishawata وبعد ذلك في المانيا بواسطة Berliner (Baum واخـــرون ١٩٩٩). لقـــد وجـــدت الاف سلالات B.t. (Lereclus ١٩٩٣). كـــل ســـلالة تنـــتج بللورات البروتين الخاصة بها التى تبيد الحشرات او الدلتا-اندوتوكســـين. النشـــاط الابـــادي للتوكســـينات من كل سلالة تختلف عن الاخري. الدلتا-اندوتوكســـين تشفر بجين فردي على البلازميد في بكتريا (Whalon and Mcgaughey ١٩٩٨). حـــزمة اندوتوكسينات Bt تؤثر على انواع مختلفة من رتب حشرية مثل غمدية الاجـــنحة (الخـــنافس) وحرشفية الاجنحة (الفراشات وابي دقيقات) وثنائية الاجنحة (الذباب والـــبعوض). كذلـــك وجد ان بعض دلتا-اندوتوكسينات Bt ذات سمية تساوي سمية بعض المبيدات الفوسفورية الشائعة. من ناحية اخري فانه على خلاف المبيدات الفوسفورية والتى لهـــا تاثـــيرات عامة فان توكسينات Bt متخصصة جدا لبعض الحشرات الضارة ومن ثم

تكــون امــنه علــى معظم الحشرات النافعة والحيوانات الأخرى. بالاضافه الى ذلك فان توكسينات Bt قابلة للانهيار الحيوي biodegradable ولا تظل ثابتة في البيئة.

الخلفية التاريخية والتطور الزمنى للباسيلليس Bt:

لقــد أصبحت Bt متاحة تجاريا لاول مرة كمبيد حشري في فرنسا عام ١٩٣٨ ثم دخــل امــريكا على نطاق تجاري في الخمسينات. لسنوات عديدة تم تجهيز Bt بداية كى يلائم الرش على المحاصيل. بسبب عدم الثبات في Bt كان لزاما وضرورة تكرار المعاملة فــي المــراحل الاولى من ادخال هذه الوسيلة الحيوية في مكافحة الآفات . في الثمانينات حــدث نمــو ســريع فــي اتجاه الاستخدامات التجارية لمستحضرات Bt على نفس نسق المبــيدات الحشــرية المخلقــة التى بدأت تفقد فعاليتها بسبب تطور المقاومة في الحشرات المســتهدفة او لعــدم ملائمــتها مــع القيود البيئية الوافدة وكذلك بسبب نمو مجال الهندسة الوراثــية. فــي عــام ١٩٨٧ ظهــرت اول تقارير عن ادخال الجينات التى تشفر الدلتا- اندوتوكســين للباسيلليس Bt في النباتات. لقد كانت النباتات المهندسة وراثيا الاولى التى تم تعبــير توكسينات Bt هي الدخان والطماطم. النباتات الاولى التى ادخل فيها المبيد Bt هي الذرة البكتيري سجلت في امريكا بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA عام ١٩٩٥ (USEPA ١٩٩٩-ب). الان ســادت النباتات المهندسة وراثيا بالبكتريا Bt لتشمل الذرة والــبطاطس والارز. هندسة النباتات لتعبر عن دلتا-اندوتوكسين Bt ذات فائدة خاصة ضد الأفــات الــتى تهاجم الاجزاء النباتية التى يصعب حمايتها جيدا بتطبيق المبيدات الحشرية التقلــيدية. المــثال الواضح عن هذا الوضع الحماية ضد ثاقبة الذرة الاوربية. يرقات هذه الحشــرة الــتابعة لرتبة حرشفية الاجنحة تثقب في ساق نبات الذرة وتحطم العود. بمجرد دخــول الحشــرة تصبح في ما من المبيد. مع التوكسينات الموجودة في النباتات المهندسة وراثــيا تــتعرض الــيرقات للسم ومن ثم يتم السيطرة على الضرر (Ely ١٩٩٣). بسبب فوائــد كهــذه اصــبح Bt ذات وجــود اساسي في الزراعة. في عام ١٩٩٧ غطي القطن البكتــيري Bt والذرة Bt والبطاطس Bt ما يقرب من ١٠ مليون اكر في امريكا وحدها. لقــد تــم الــتوزيع والتســويق التجاري لهذه المحاصيل بشكل عريض في كندا، اليابان، المكســيك، الارجنتيــن واستراليا (Frutos واخرون ١٩٩٩). بالرغم من شيوع استخدام البكــتريا Bt في صورة نباتات مهندسة وراثيا فان رش مستحضرات BT مازالت واسعة الانتشار ايضا.

كيفية احداث الفعل Mode of action: بكتريا Bt تسبب موت مباشر في الحشرات كما ان عـزلات التوكسين من السلالات المختلفة اظهرت نفس طريقة احداث الفعل. بعد تناول بلـورات الدلتا-اندوتوكسين فانها تذوب في معدة الحشرة ثم تحرر التوكسينات الاولية التي تعملهـا. هـذه التوكسينات تتحلل بروتينيا الى اجزاء احدها يرتبط بخلايا الغشاء الطلائي للمعـدة. البروتين المنشط يحدث خلل في التوازن الاسموزي لهذه الخلايا من خلال تكوين ثقـوب في جدران الخلية مما يسبب تحلل الخلايا Van Rie)Lyse واخرون ١٩٩٢). بعد ذلـك يحـدث شلل في المعدة ثم تتوقف الحشرة عن التغذية وبعدها تموت معظم الحشرات خـلال سـاعات قلـيلة مـن التناول (مارون وماكنتوش ١٩٩٣). قدرة الارتباط لوحدات التوكسـين هـذه ترتـبط مباشرة بالسمية وهذا يعني ان الارتباط لا يعني ضرورة حدوث السمية.

توكسينات Bt:

يوجد ٣٤ تحت نوع من الباسيلليس ثورينجيينسيز Bt من اكثرها شيوعا تحت النوع كورسـتاكي (ضـد حرشفية الاجنحة) واسرائيليسيز (ضد ثنائية الاجنحة خاصة البعوض والذبـاب الاسود) وتحت النوع تينيبريونيس (ضد غمدية الاجنحة). لقد تم عمل نوعين من البروتيـنات البلورية ذات الابادة الحشرية من هذه تحت الانواع المختلفة وتم تعريفها وهي Cyt (ستيوليسـينات cytoly sins اوليسـينات خلويـة) وcry (دلتا-اندوتوكسين بللورية Crystal delta-indotoxin). لقـد قام هوفت وويتلي (١٩٨٩) بتعريف اقسام اربعة من جيـنات الكراي cry وقسمان من جينات cyt التوكسينات cry I, cryII فعالة ضد غمدية الاجـنحة. بينما تنتج توكسينات cryIII بواسطة تحت النوع تينيبريونيس وتولويرثي وينتج cryIV بواسـطة تحت النوع اسرائيلينسيز فانه بوجه عام وجد ارتباط قليل جدا بين بعض التوكسـينات وبعـض تحـت انواع الباسيلليس الموجودة . توكسينات الكراي Cry ترتبط بمسـتقبلات خاصـة على الخلايا في معدة الحشرة. جينات cyt فعالة ضد حشرات ثنائية الاجنحة والغمدية كما اظهرت بعض الفاعلية ضد حشرات نصفية الاجنحة (البق الحقيقي) والصراصـير والنمل (Frutos واخرون ١٩٩٩). توكسينات cyt على خلاف توكيسنات cry لم تتميز مع مواقع ارتباط خاصة (Lereclus واخرون ١٩٩٣).

المقاومة للمبيدات الحشرية Insecticide Resistance :

بالـرغم من ان بكتريا Bt تختلف عن المبيدات الحشرية التقليدية في الاصل وكيفية احداث الفعل فانها مازالت تعاني بعض المشاكل التى يعانيها أي مبيد. المشكلة الكبري التى تجابـه مكافحـة الحشـرات بالمبيد الحشري هو نشوء وتطور المقاومة في الحشرات لهذا المبـيد. الحالات الاولى التى سجلت عن المقاومة للمبيدات المخلقة الرائدة بفعل الحشرات حدثـت مـنذ مـا يزيد عن ٥٠ سنة مضت. بعدها بثلاثين عاما أي في عام ١٩٧٩ اعلن برنامج البيئة التابع للامم المتحدة ان ظهور المقاومة لفعل المبيدات تعتبر من اكبر المشاكل البيئـية الخطـيرة. الخطورة تتأتى من المشاكل الخاصة بالامن الغذائي حيث ان المقاومة للمبـيدات معـناها زيـادة الفقد الذي تحدثه الآفات وانتشار الامراض بواسطة الحشرات المقاومة وادخال مبيدات جديدة اكثر سمية وضررا على البيئة بعد تطور المقاومة للانواع التى كانت سائدة و استخدام كميات اكبر واكبر من الكيميائيات التى تطورت مقاومة ضدها فعلا (Pimentel and Burgess ١٩٨٥).

كـيف تـتطور المقاومة ؟ لقد نجحت الحشرات في تطوير المقاومة لكل نوع من المبيدات تقريـبا. المقاومـة للمبيدات الاخري اعطت الفرصة للباسيللس ثورينجيسيز كي تفرض نفسها في مكافحة الآفات وتصبح من بين الوسائل الحيوية الشائعة في برامج ادارة الآفات . لقـد تطـورت المقاومة للمبيد الحشري بسبب الاختلافات الوراثية في المجاميع الكبيرة للحشرة. قليل من الافراد في المجموع الاصلي للحشرة لا تتاثر بالمبيد تحت التناول. بوجه عام فان الافراد التى لم تتاثر (المقاومة) تختلف عن الافراد التى تتاثر (الحساسة) سواء في طبـيعة الهـدف الذي تعمل عليه جزيئات المبيد في الحشرة او في الطريقة التى تعمل بها الحشـرة علـى تكسير الجزيئات السامة للمبيد (Michaud ١٩٧٧). عندما يستخدم المبيد الحشـري فـان الافـراد الذين لم يتاثروا بالمبيد تمثل الافراد التى تستمر في الحياة لنقل جيـناتها للاجيال التالية. مع مرور الوقت يزداد نسبة الافراد التى لم تتاثر بالمبيد يوما بعد يـوم. بالاضـافه الـى الضـرر الذي يحدث من جراء زيادة اعداد الافراد المقاومة فان محـاولات السـيطرة علـى المقاومة في الحشرة قد تتسبب بشكل غير مباشر في الظهور الوبائي وما يستتبع ذلك من زيادة الضرر و التلف على النباتات (Hoy ١٩٩٨).

العوامل التى تؤثر على المقاومة:

توجـد عوامل عديدة تزيد من معدل تطور المقاومة للمبيد من قبل الحشرات. بعض العوامـل ترتـبط بمجمـوع الحشرة نفسها : الانواع ذات معدلات التناسل العالية، فترات

قصـــيرة للجـــيل، اعـــداد كبيرة من النسل، وبشكل اكبر فانه يتطور مجموع اكثر مقاومة وبســـرعة مـــن المجاميع المحلية المختلفة وراثيا. بصرف النظر عن ان الاساس الوراثي للمقاومة في الحشرات سائد او متنحي فانه يمثل اهمية. العوامل الاخري تعتمد على المبيد نفســـه. المقاومـــة تتطور بسرعة اكبر مع المبيدات الحشرية الاكثر ثباتا، استمرار فاعلية المبـــيد فـــي البيـــئة يزيد من فرص تعرض الافراد الحساسة للتوكسين ثم تموت، لذلك لا توصـــل الصـــفات والعلاقات الخاصة بين المبيد والسلالة الحساسة الى الجيل التالى. هذا الانتخاب يحدث بقوة مع الحشرات المقاومة لانها هي الوحيدة التى تستمر في الحياة. على نفـــس النسق والمفهومية فان الاستخدام المتكرر للمبيدات غير الثابتة يؤدي الى نفس التأثير (Wood ١٩٨١). كذلـــك فـــان مجامـــيع الحشرة ذات التغيير القليل في حزمة الجين في الافـــراد الجديـــدة الحساســـة غير المعرضة تطور مقاومة كذلك بشكل اسهل (Comins ١٩٧٧). المجامـــيع الـــتى تعرضـــت فـــي الماضي لمبيد حشري ذات طريقة احداث فعل مشـــابهة لـــتلك التى يحدثها المبيد الحشري الجديد تكون مقاومة بسرعة للتوكسين الجديد. تعرف هذه الظاهرة بالمقاومة المشتركة (pimentel and Burgess ١٩٨٥).

تطور المقاومة لبكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز:

الســـؤال المطـــروح في البداية يقول ويستفسر عن أهمية هذا الموضوع. كما لوحظ قـــبلا فـــان مشـــكلة تطور المقاومة للمبيدات تمثل مشكلة كبيرة وحقيقية ليس في المجال الزراعـــي فقط ولكن في الصحة والاقتصاد كذلك. تطور المقاومة للباسيلليس ثورينجيسيز أو لتوكســـينات Bt تعتبر من قبيل سوء الحظ. توكسينات Bt اكثر تخصصية للافه واكثر أمان بيئي بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية ولكنها فعالة ضد الحشرات المستهدفة.لهذه الاســـباب اصـــبحت مستحضـــرات الرش ببكتريا Bt متاحة لمزارعي الزراعة العضوية كـــاحدي اهم وسائل المكافحة الحيوية. اذا اصبحت المنتجات Bt غير فعالة بسبب المقاومة فســـوف تفقد الزراعة العضوية مصدر هام لا يمكن تعويضه او الاستغناء عنه. قد يتساءل البعض عن اهم التقارير التى اشارت الى مقاومة الحشرات لفعل مستحضرات بكتريا Bt. فـــي عـــام ١٩٨٥ تم نشر اول دليل عن تطور المقاومة للدلتا-اندوتوكسين Bt. لقد وجدت مســـتويات منخفضـــة مـــن المقاومـــة في حشرة فراشة الدقيق الهندية في مخازن الحبوب المعاملـــة ببكـــتريا Bt. لقـــد اتضح في ظروف تخزين كهذه انه قد تتكون مقاومة في هذه الحشـــرة للباســـيلليس خـــلال موســـم واحد فقط. قبل ذلك لم تسجل حالات مقاومة للدلتا- اندوتوكســـين Bt لا في المعمل ولا في الحقل وكانت هناك جهود كبيرة لانتخاب السلالات

المقاومـــة في المعمل (Mr Gaughey ١٩٨٥). لقد امكن تمييز الاحتمالات العالية لتطور المقاومـــة ضـــد Bt وتوكسيناتها عندما صدر التقرير من هاواي-فلوريدا ونيويورك في امريكا عام ١٩٩٠ بعد ثلاثين عاما من الظهور الاول للبكتريا على المستوي التجاري. لقد وجـــد ان الـــنوع الذي فقد حساسيته لتوكسين Bt كان بلوتيلا زيلوستيلا التي عوملت رشا بمستحضـــرات التوكســـينات. فـــي نفس الوقت ظهرت تقارير تفيد بمقاومة نفس الحشرة للبكـــتريا Bt بعـــد الاســـتخدام المكـــثف في الدول الاخري مثل اليابان والصين والفلبين وتايلاند. صدر تقرير من ماليزيا عام ١٩٩٠ عن مقاومة الفراشة ذات الظهر الماسي وقد اكد الفلاحون هذه الظاهرة. لذلك يمكن القول ان هذه الحشرة قد تكون الوحيدة التي طورت مقاومة ضد Bt خارج المعمل.

خلال الخمسة عشر عاما منذ اكتشاف المقاومة في حشرة p.interpunctella حدث انـــتخاب في مجاميع المعمل للمقاومة لبكتريا Bt لما يزيد عن ١٣ نوع من الحشرات. لقد طور النوع من الحشرات مقاومة لمختلف السلالات من توكسين Bt في المعمل وليس في الحقـــل ومـــنها ثاقـــبة الـــذرة الاوربية، دودة براعم الدخان، دودة اللوز القرنفلية، بعوض الكيولـــيكس، الفراشـــة الماسية، خنفساء اوراق القطن، الفراشة الغجرية، خنفساء كلورادو البطاطس وبعوض الحمي الصفراء. لقد اختبرت انواع اخري في المعمل وظهرت محتفظة بالحساســـية لبكتريا Bt. بينما كونت وطورت بعض الانواع مقاومة في المعمل ولم يظهر أي مـــنها مقاومـــة في الحقل. هذه النتائج يجب ان تلقي الاهتمام على غرار ما حدث عام ١٩٨٥، ١٩٩٠.

ميكانيكية المقاومة Mechanism of Resistance:

كـــي نـــتعامل مـــع بكتريا Bt لابد من فهم التقنيات او الميكانيكيات التي تقاوم بها الحشـــرات فعـــل البكـــتريا وتوكسيناتها. التقنيات التي تقاوم بها الحشرة التاثيرات السامة لتوكســـينات بكـــتريا Bt مـــن الطبيعي ان تكون مرتبطة بكيفية احداث فعل Bt. كما سبق القول فان التوكسينات الاولية للبكتريا Bt protoxins تنشط بواسطة انزيمات البروتييزيس proteases في معدة الحشرة وبعد التنشيط ترتبط بالمستقبلات على الغشاء الطلائي. لذلك فانـــه بعـــد ذلـــك تحدث عدد من الخطوات تؤدي الى موت الحشرة. ان تخصصية طريقة احداث الفعل معقدة وتختلف فيما بين الحشرات وسلالات Bt شديدة التعقيد تمشيا مع حقيقة انـــه فـــيما قـــبل ١٩٨٥ كـــان يظن ان التعقيدات نفسها سوف تمنع من تطور المقاومة.

ميكانيكيات المقاومة معقدة بنفس القدر بسبب ان العديد من الخطوات تشترك في العملية الكلية لاحداث الفعل بواسطة Bt كما ان هناك العديد من طرق ايقاف العملية ومقاومة التوكسين. لقد درست الميكانيكية الفعلية للمقاومة في القليل من انواع الحشرات حيث تم انتخاب الافراد المقاومة في المعمل. اظهرت الدراسات ان اكثر تقنية وميكانيكية للمقاومة تتضمن التغير في مستقبلات الغشاء والتى يحدث بسببها تنشيط للتوكسينات حتي ترتبط عليها. في حشرة بلوتليا زيلوستيلا يكون خفض ارتباط التوكسين هي التقنية الوحيدة للمقاومة (Tabashink واخرون ١٩٧٧). اظهرت دراسة اجريت عام ١٩٩٢ ان المقاومة لتوكسينات Bt cryIAb ترتبط بالخفض في عدد مستقبلات cryIAb في المعدة (فانري واخرون ١٩٩٢). لقد اتضح ان p.interpunctella تملك تقنية خفض الارتباط بدرجة خفض ٥٠ مرة في ارتباط cry IA المرتبط مع خفض ١٠٠ مرة في السمية. هذا لا يعني وجود قليل من مواقع الارتباط في السلالة المقاومة من الحشرة ولكن ببساطة شديدة اقل مقدرة على الارتباط. بالاضافه الى نقص المقدرة على الارتباط فان المقاومة في هذه الحشرة ترتبط بغياب بروتيينيز المعدة. من المفترض ان هذا البروتينيز يرتبط بالانقسام بانزيمات تحلل البروتين وتنشيط التوكسينات الاولية لبكتريا Oppert) Bt واخرون ١٩٩٧).

التقنيتان التى ذكرت اعلاه عن المقاومة وهما خفض ارتباط التوكسين/مواقع الارتباط ونقص تنشيط التوكسين كان يعتقد انهما يحدثان معا في دودة اللوز الامريكية (Michaud ١٩٩٧). الدراسات هذه ليست قاطعة النتائج حيث اظهرت دراسة ١٩٩١ خفض في قابلية الارتباط للتوكسين cryIA وزيادة عدد مواقع ارتباط cryIA وزيادة عدد مواقع ارتباط CryIA في الافراد المقاومة وهي تتعارض مع الدراسة التى اوضحت زيادة في مقدرة ارتباط Cry IA ونقص عدد مواقع الارتباط للتوكسين Cry IA في الافراد المقاومة (مكنتوش ١٩٩١ وتاباشنيك ١٩٩٤–ب). في النهاية اظهرت حشرة دودة البراعم c.fumiferana تقنيات مختلفة بشكل كامل للمقاومة توكسينات cry IA تفقد نشاطها بواسطة الترسيب مع معقد البروتين الموجود في المعدة (Michaud ١٩٩٧).

<u>ادارة التعامل مع المقاومة Resistance Mangement:</u>

اهداف وانواع ادارة التعامل مع المقاومة: لقد تكونت قناعة تامة بان المقاومة تعتبر مردود لا يمكن تجنب حدوثه مع استخدام أي مبيد حشري. هدف ما يعرف بادارة التعامل

مـــع المقاومة ليس ايقاف المقاومة كلية ولكن احداث بطيء في تطورها واطالة فترة حياة المبـــيد فعالـــة لاطـــول فترة ممكنة (comins ١٩٧٧). بعض العلماء اصبحوا يفضلون الاشارة لهذا العلم بالمصطلح "تخفيف المقاومة Resistance mitigation" بدلا من ادارة الـــتعامل مع المقاومة "Resistance management" لان الاولى تصف طبيعة التعامل الـــتى تقـــوم بهـــا للتغلب على مشكلة المقاومة (Hoy ١٩٩٨). من الضروري مضاداة المقاومة كي نحافظ على فاعلية بكتريا Bt.

توجد ثلاثة اهداف لادارة التعامل مع المقاومة:

ـ تجنب المقاومة حيثما وجدت وبقدر الامكان اذا كان ذلك ممكنا

ـ تاخير حدوث المقاومة لا طول فترة أمكن

ـ تحويل المجاميع المقاومة الى حساسة (Croft ١٩٩٠).

لقد نفذت العديد من البرامج الخاصة بالتعامل مع المقاومة خلال الخمسة والعشرين ســـنة الماضـــية معظمها تناول بجدية الحفاظ على الحساسية لبكتريا Bt. النباتات المقاومة المهندســـة وراثـــيا ببكتريا Bt زاد استخدامها ووجهت في اتجاه تطور المقاومة. النباتات المهندســـة وراثيا تعرض الحشرات للتوكسينات باستمرار حتي في الاوقات التى لا تسبب خلالها ضرر اقتصادي (ماليت وبورتر ١٩٩٢).

بـــرامج ادارة المقاومـــة تستخدم في العادة واحد من ثلاثة اقترابات اساسية لتاخير المقاومـــة. احد الاقترابات تستهدف تقليل التعرض للتوكسينات و/او السماح بالتزاوج بين الحشـــرات المقاومـــة ومجمـــوع كبير من الحشرات الحساسة لجعل والحفاظ على صفات الحساســـية مســـتمرة في حزمة الجينات. هذه الاستراتيجيات تشمل التعبير عن التوكسينات فـــي النســـيج المعين او في الوقت المعين، استخدام المخاليط، اطلاق الذكور الحساسة في الحقـــل فـــي توقيتات او مناسبات معنية او بصفة دورية او غيرها. الاقتراب الاخر يركز علـــى دمـــج طـــرق مكافحـــة بدرجـــة تفـــوق مقاومـــتها لاكثر من وسيلة على التوالي. الاســـتراتيجيات فـــي هـــذا الاقـــتراب تشـــمل تكدس الجين او جرعات عالية او مخاليط التوكســـينات ذات طـــرق احـــداث الفعل كاملة الاختلافات وكذلك خلط جرعة واطية من التوكســـين والاعداء الطبيعية. الاقتراب الاخير شديد الاختلاف في طبيعته عما ذكر قبلا. هـــذه الاســـتراتيجية تســـتخدم "المصـــائد النباتية trap plants" لجذب الآفات بعيدا عن المحاصيل.

الحفاظ على المجاميع الحساسة كي تتزاوج مع الافراد المقاومة:

اطلاق الحشرات الحساسة في المجموع المعرض: من بين الاستراتيجيات القديمة تلك التى تضمنت تزاوج الحشرات المقاومة مع الحساسة. بساطة هذه الافكار تتمثل في الاطلاق الدوري للذكور الحساسة المرباة في المعمل او المجموعة من مكان ما في المجموع المعامل ببكتريا Bt. من الناحية النظرية فان هذا الاسلوب يجعل من الممكن الحفاظ على تكرارية المقاومة في المجموع تحت المستوي الذي حدد سابقا (curtis ١٩٨١). هذه الطريقة يفضل استخدامها على مجاميع الحشرات مثل البعوض والتى فيها تستهدف المبيدات الحشرية الاناث (wood، ١٩٨١). بكتريا Bt ليست مبيد متخصص لجنس ما (اناث او ذكور) مع وجود خطر من موت العديد من الذكور الحساسة التى تم اطلاقها في حقول البكتريا Bt قبل التزاوج. بالاضافة الى ذلك فان جدوي تربية ونقل مستعمرات كبيرة محل تساؤل.

المأوي Refugia:

بناء على الاستراتيجية البسيطة التى وضعت اعلاه فان العديد من البرامج تضمنت نشر مجموع الحشرات الحساسة على امل ان تنتشر في المجموع المعامل وتتزاوج مع افراده. هذا هو اساس استراتيجية المأوي refuge strategy. المأوي قد يختلف في الحجم و المكان وهو يعتبر مخزن للحشرات الحساسة. من الناحية النموذجية فان العديد من الافراد الحساسة سوف تتزاوج مع قليل من الافراد المقاومة مما يخلق معدل قليل جدا من المقاومة الشاملة في الاجيال التالية. نجاح استراتيجية المأوي يعتمد على اربعة ظروف : ان تكون صفة المقاومة متنحية، هناك تزاوج عشوائي، الحشرات الكاملة تتحرك بشكل كافي بين النباتات السامة، هناك قصور في الفعل الابادي ضد الحشرات في المأوي. اذا لم تتحرك الحشرات الكاملة بين المأوي والمناطق المعاملة فان المقاومة تتطور سريعا في المناطق المعاملة بينما يستمر المجموع الحساس في التزواج مع بعض في المناطق غير المعاملة. اذا تعرض المأوي لاي نوع من المبيدات سوف ينخفض تزاوج المجموع الحساس المتاح للتزاوج مع الافراد المعرضة لبكتريا Bt (Tabashnik ١٩٧٧). المأوي الموجود على طول المساحات المعاملة وخارج للحقل يكون اكثر نجاحا عن خطوط النباتات المأوي التى تزرع في الحقل مع خطوط نباتات البكتريا Bt. كلما كبرت مساحة المأوي يتأخر حدوث المقاومة على المدي الطويل (frutos ١٩٩٩). المقاومة سوف تتطور حتما عندما تؤدي هجرة الافراد المقاومة في المجموع الحساس الى وصول

المجمــوع المقاومة في النهاية في المساحات غير المعاملة الى نسبة عالية بما يحافظ على تــوازن المــأوي كما صممت في البداية (comins ١٩٧٧). لقد تمت التوصية بان تكون مســاحة المأوي تغطي ٥ الى ١٠% من المساحة الكلية للمحصول في دراسة اجريت عام ١٩٩٢ (Mallet and Porter ١٩٩٢). اظهــرت نمــاذج الحاســب الالــي باســتخدام المعلومات عن دورة حياة حشرات حرشفية الاجنحة ان مساحة المحصول مع ١٠% مأوي اخــرت المقاومة حتي ٥ الى ١١٢٠ جيل (Tabashnik ١٩٩٤-أ). لقد اثبت برنامج ١٠ % مــأوي الاســهام في استمرار حساسية حشرة X.xylostella لتحت انواع الباسيلليس Bt aizawai. هــناك انــواع اخــري مــن الحشرات لم تستجب بنفس القدر لاستراتيجية المأوي بهذا الحجم (Liu and Tabashnik ١٩٩٧).

بيــنما تمثل استراتيجية المأوي نجاحا من المفهوم العام الا ان الربط والارتباط بين ما يحدث في الدراسات المعملية وما يحدث في الحقل المتباين ليس من السهل التنبؤ به. في عــام ١٩٩٩ اظهرت احدي الدراسات ان التزاوج العشوائي قد لا يمثل بالضرورة فرضية امــنة للحشــرات في الحقل. مجاميع دودة اللوز القرنفلية المقاومة لبكتريا Bt تستغرق في المتوسط ٥,٧ يوم اكثر لتكوين تطور كامل من المجاميع الحساسة. بسبب ان اكثر من ٨٠ % من مجاميع الحشرة تتزاوج خلال ٣ أيام من الفقس والخروج وتموت بعد التزاوج فورا فــان ذلــك يكــون في صالح التزاوج المتناسق وليس العشوائي. الافراد الحساسة سوف تــتزاوج مع بعضها حتي قبل ان تفقس الافراد المقاومة (Liu واخرون ١٩٩٩). بالطبع فــان الدرجة التى عندها تتاثر استراتيجية المأوي مع حشرة دودة اللوز القرنفلية في الحقل تعتمد على تداخل الاجيال وربما على عوامل اخري ايضا. هناك عامل اخر يصعب التنبؤ بــه وهو هجرة الحشرات الكاملة عندما تتاح لها فرصة التزاوج. هذه المعلومات مفيدة في اتخــاذ قــرار أي الاماكن افضل كمأوي. ان استراتيجية المأوي وغير كاملة ولكن نجاحها يتاتــي من البيانات المتاحة عنها. من الاهمية بمكان ان تتذكر ان المجموع الحساس يعتبر مصــدر يمكن استنزافة (wood ١٩٨٠). طريقة المأوي غالبا تستخدم بالدمج مع غيرها مــن الاســتراتيجيات لزيادة كفاءة كلا الوسيلتين. من المشاكل التى تدخل تحت نطاق سوء الحظ عدم ترحيب الفلاحين لترك مساحة جانبا تعمل كمأوي دون زراعة. هذا قرار صعب اتخاذه بسبب المقارنة والمنافسة بين الفلاحين (Mallet and porter ١٩٩٢).

مخاليط النباتات seed Mixtures: مخاليط النباتات على غرار المأوي تعمل على تأخير المقاومــة من خلال صيانة المجموع الحساس من الحشرة للتزاوج. زراعة الحقل باستخدام

هــذه الاســتراتيجية ســوف تؤدي الى خلط عشوائي للنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt ونــباتات خالية من التوكسينات. لقد اجريت دراستان لتحديد كفاءة مخاليط النباتات مقارنة بالمــأوي refugia. لقد استخدم ماليت وبورتر (١٩٩٢) نمذجة الحاسب الالى لتوضيح ان مخالــيط النباتات تسرع من تطور المقاومة بالمقارنة بالحقول المحتوية على نباتات سامة لوحدهــا. بعــد سنتان اظهرت دراسة معاكسة ان مخاليط النباتات أفضل من الحقول ذات النباتات النقية ببكتريا Bt. لقد اتفقت الدراستان على ان استراتيجية المأوي اكثر نجاحا من اســلوب خلط النباتات وفي العديد من الحالات اتضح انها سياسة المأوي مع خلط النباتات تكــون اكــثر نجاحــا من خلال برنامج واحد. السبب في الاداء غير الجيد لاسلوب خليط النــباتات كاستراتيجة لمجابهة المقاومة يرتبط عن قرب بالميزة النظرية لمخاليط النباتات. بيــنما تستطيع الافراد المعرضة و المقاومة بسبب احتوائها على بكتريا Bt كما ان سهولة انتقال الافراد جعلت الحشرات الحساسة في خطر من جراء التعرض الفائق لبكتريا Bt من النــباتات المجاورة. ان العمل في صالح مخاليط النباتات يتمثل في دور سلوك بعض انواع الحشــرات في تفضيل النباتات الخالية من التوكسينات عن النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt ممــا يخفــض من التغذية في الحشرات الحساسة المعرضة لنباتات Bt. لقد لوحظ هذا الســلوك في المعمل مع مجاميع حشرات دودة اللوز الامريكية. نحن لا نعلم عن مدي هذا السلوك في الحقل ولا استجابة الانواع الاخري تجاه هذا السلوك (ماليت وبورتر ١٩٩٢).

الموزايك:

هـــو يعني قطع زراعية معاملة ببكتريا Bt واخري غير معاملة **Mosaics**: هذا الاقتراب يمــاثل اســتراتيجية المــأوي فــي ان كلاهما يتضمن قطع من الحقول بها نباتات مبكترة patchwork of Bt ومســاحات اخــري غير المعاملة بالبكتريا تعامل بمبيدات اخري او ســلالة اخــري مــن البكــتريا Bt او تكــون غير معاملة بشكل كافي. كي تصبح هذه الاستراتيجية فعالة يكون من الاهمية عدم حدوث مقاومة مشتركة cross resistance بين نوعي المبيدات (بمعني ان المقاومة لواحد منها يجب الا يرتبط ايجابيا او يساعد في تطوير المقاومــة للمبيد الاخر) (Tabashnik ١٩٩٤–ب). في الحقيقة يفضل ان تكون المقاومة المشــتركة ســالبة (Hoy ١٩٩٨). الــنموذج علــى غرار استراتيجية المأوي يعتمد على فرضــية حــدوث انتقال او هجرة كافية للحشرات بين القطع الحقلية للموازيك. استراتيجية الموزايــك تعرضــت لقليل من التقييم التجريبي ولكن النماذج ادت الى الاقتراح بانها غير مفــيدة لانه يمكن ان تنتهي العملية بالانتخاب المتزامن للمقاومة ضد كلا التوكسينات بدلا مــن تاخــير حــدوث المقاومة لكليهما. هناك دراسة واحدة فقط عضدت نموذج واقتراب الموزايك. اظهرت هذه الدراسة انه اذا كان مجموع حشرات البعوض موزع بتجانس عبر موزايــك مــن مبيدين على نفس القدر من الفاعلية واذا كانت معدلات الهجرة والاستقرار متســاوية في كل القطع التجريبية الحقلية فان الموزايك يستطيع تاخير تطور المقاومة في الحشرات.

الــدورات Rotations: بديــل استراتيجية الموزايك تتمثل في اقتراب الدورات. في هذا الــنظام يــتم ترتيــب اســتخدام مبيديــن حشريين او اكثر بشكل مؤقت اكثر منه مكاني spatially. اســتخدام المبيديــن او اكثر بالتتابع و ليس بالتزامن اظهرت كفاءة في تاخير المقاومــة بشــكل نسبي (wood١٩٩٨). على غرار الموزايك فان الدورات لايمكن ان تنجح اذا كان هناك مقاومة مشتركة بين المبيدات الحشرية. منطقية الدورات تتمثل في انه بسبب وجود تكاليف مرتبطة بالمقاومة فانه وحينما لا يتعرض مجموع الحشرات للمبيد فان تكرارية حدوث المقاومة لهذا المبيد سوف تنخفض (Hoy ١٩٩٨). لسوء الحظ فانه لوحظ انــه بعــد استبعاد الضغط الانتخابي للمقاومة لبكتريا Bt (خلال الفترات التى يستخدم فيها بكتريا Bt) فان تكرارية حدوث المقاومة في المجموع تظل ثابتة او تتناقص ببطيء شديد. بالاضــافة الى ذلك فان التكاليف المرتبطة بتطور المقاومة عادة ما تهمل لذلك فانه يجب

عدم اعتبار الضغط الانتخابي في الافراد الحساسة لبكتريا Bt خلال فترات الدورات بدون بكتريا Bt.

التعبــير عــن التوكسين في النسيج الخاص او الوقت الخاص: هذا الاقتراب يدخل تحــت نطــاق اســتراتيجيات الادارة والتى تستهدف لتقليل التعرض الزائد لبكتريا Bt من خــلال هندسة النباتات وراثيا كي تعبر عن جينات التوكسين فقط في اوقات الحاجة او في اجــزاء النــباتات فقط ذات الأهمية الاقتصادية أو إجبارية اكثر لهجوم الآفات (Frutos واخــرون ١٩٩٩). هذا الاقتراب يشابه نظام المأوي وخلط النباتات في ان النباتات نفسها تقــدم مأواها الذاتي. يجب ان تطور النباتات لانتاج توكسينات فقط بعد حد حرج للضرر. فــي اتجــاه التعبــير في نسيج خاص فان الدراسات عن التداخل بين آفة خاصة والنبات المســتهدف ادت الى الاقتراح بتطوير الاستراتيجيات. على سبيل المثال فان نباتات القطن الــتى تهاجم بواسطة ديدان اللوز يجب ان تنتج توكسين فقد في انسجة اللوز الصغير وهذا هــو الجزء الهام من النباتات. بالاضآفة الى الحماية الخاصة للنسيج النباتي الحرج فانه قد يؤثــر فقــط على جيل واحد من ديدان اللوز (التى تعيش وقت اللوز الصغير) مما يجنب الضغط الانتخابي الثابت الذي يزيد و يسرع من تطور ونشوء المقاومة(Gould ١٩٨٨). التعبــير عــن النسيج الخاص قد لا يكون الاختبار المناسب لبعض الآفات والتى تستهدف داخل النبات مثل ثاقبة الذرة الامريكية (Monsanto ٢٠٠٠). مع معظم الانواع لا يعرف الا القلــيل عــن سلوك الحشرات في الحقل ولذلك فان الطرق الفعالة للتعبير البكتيري Bt الموجــودة في نسيج معين او وقت معين غير معروفة. بسبب التعبير عن توكسين خاص كمــا لوحظ اعلاه يقدم مأوي بطريقة مثل او مشابهة لخلط النباتات فان نفس النتائج السالبة قد تؤدي الى التعبير الخاص كما نتج مع خلط النباتات.

دمج أو خلط طرق مكافحة الحشرة combining insect control methods

الاقتراب الثاني لادارة التعامل مع المقاومة بخلط او دمج العناصر القديمة والجديدة لقــد افــترض ان المقاومة تكون اقل حدوثا وتطوراً لطريقتين من المكافحة بالتزامن عنه لطــريقة واحدة. بالنسبة لطريقتين او وسيلتين فان تكون المقاومة للخليط اولهما معا بتأخر بالمقارنـــة فـــي حالة استخدام كل وسيلة بمفردها في ترتيبات مؤقتة او وقتيه. ان استخدام اثــنان او اكثر من طرق المكافحة في وقت ما تعتبر نوع من الضمان او التأمين في حالة فقــد احدهمــا الفاعلــية او الكفاءة. على نفس النسق تتمثل طريقة زيادة الفاعلية للتوكسين

باســـتخدام جــرعة عالـــية كمـــا هو الحال مع استخدام جرعة واحدة في المكافحة الاولى وجرعة ثانية في الاخري. هذا معناه اختلاف النظرية عن المألوف.

استخدام مبيدات منفردة Use of Multiple insecticides:

بـــدأت هـــذه الاســـتراتيجيات من خلال الخلط البسيط لاثنين او اكثر من المبيدات الحشـــرية فـــي نفس الحقل مثل توكسين Bt وتوكسين غير Bt. ضرورة هذا الاقتراب او العامل المحدد لنجاحه عدم وجود مقاومة مشتركة بين هذه المبيدات. من الصعوبة افتراض عـــدم وجـــود درجة من المقاومة المشتركة بين أي من ازواج المبيدات ولو ان الدراسات اثبتـــت حـــدوث هذه الظاهرة حتي بين المبيدات ذات طرق احداث الفعل المختلفة (Hoy ١٩٩٨). لـــم تثبـــت أي مـــن التجارب ان استخدام خلائط المبيدات بجرعات قاتلة يؤخر المقاومـــة للباسيلليس فيما عدا ان احد الدراسات اظهرت حدوث تنشيط باستخدام المنشطات synergists. المنشـــطات عـــبارة عن وسائل ليس من الضروري ان تكون قاتلة او سامة بمفـــردها ولكـــن عند استخدامها مع مبيد ما تزيد من سمية هذا المبيد. مثبطات بروتييز الســـيرين تـــزيد من سمية بكتريا Bt ضد بعض الانواع ولكن لايوجد دليل ان هذه السمية العالية قللت من تطور المقاومة.

التكدس الجيني Gene stacking:

الـــتكدس الجينـــي يشابه طريقة استخدام المخاليط ولكنها تتضمن فقط مخاليط من اثنيـــن او اكـــثر مـــن التوكســـينات المختلفة Bt cry او Bt cry وتوكسين Bt cyt. تقدم التوكسينات متزامنة في نفس الوقت ولكن لكل منها مواقع ارتباط مختلفة في معدة الحشرة (Frutos واخـــرون ١٩٩٩). هـــذه الاســـتراتيجية مبنية على نفس الفرضيات والمعايير المعمـــول بها في خلائط المبيدات. لقد اظهرت بعض الدراسات ان توكسينات cry و cyt تعمل معا حيث يعمل cyt كمادة منشطة. في دراسة اجريت عام ١٩٩٨ ساعد استخدام Bt cyt IAa فـــي حشـــرة C. scripta (Frutos واخـــرون ١٩٩٩). على نفس المنوال فان الجـــرعات غـــير القاتلة لتوكسينات cytA عندما تدمج او تخلط مع توكسينات cry IV قد تخفـــض و/او تقلل من المقاومة حتي ١٠٠٠ مثل في المجاميع المقاومة للتوكسين cry Iv لحشـــرة c. quinquefasciatus (Wirth واخرون ١٩٩٧). لقد ظهرت ادلة كبيرة تضاد أي اســـتراتيجية لاســـتخدام مخاليط من توكسينات cry المنفردة. لقد اظهرت حشرة دودة

اللـــوز الامريكية مقاومة مشتركة للعديد من توكسينات Bt Cry من السلالات العديدة. لقد اظهــرت حشــرات p. xylostella و الاخيرة مقاومة في المعمل والحقل لخمسة او ستة توكسينات Bt cry بالتزامن. لقد تم التفسير الجزئي من خلال موجدات عام ١٩٩٧ من ان جين فردي في pxylostella مسئول عن المقاومة لاربعة توكسينات Bt Cry فردية. مع تضـــمين المأوي الخارجي تصبح هذه الاستراتيجية اكثر فاعلية عن الموزايك او الدورات مع توكسينات cry المختلفة. تجدر ملاحظة انه حتي مع كمية صغيرة من المقاومة فانها قد تؤخــر تكــدس الجيــن كاستراتيجية مما يجعل من الضروري تطبيق استراتيجية المأوي (١٩٩٨ Caprio).

هــناك اســتراتيجية فعالـــة اخـــري تتمـــثل في استخدام الاعداء الطبيعية بدلا من التوكســينات الاخـــري فـــي نظام خلط مع الجرعات الواطية من بكتريا Bt. لا يمكن ان تســـتخدم هذه الاستراتيجية مع معظم المبيدات الحشرية لان لها مدي عريض من التأثيرات وكذلـــك فانهـــا تقتل الاعداء الطبيعية وكل الآفات . الاعداء الطبيعية المستخدمة قد تكون مفترســـات. او اشباه الطفيليات. الفرضية تحت هذه الاستراتيجية ذكرت قبلا عند استعراض اســـتراتيجية الـــدورات. من الناحية النظرية فان تكاليف المقاومة سوف تجعل من الآفات المقاومة اكثر حساسية لهجوم الاعداء الطبيعة. أي عدو طبيعي يستخدم يجب الا يتأثر من جـــراء الـــتعرض لبكتريا Bt. كجزء من البرامج العديدة للادارة المتكاملة للافات تستخدم جـــرعات واطية من بكتريا Bt بالتوافق مع الاعداء الطبيعية عندما لا تكون Bt قوية بما فيه الكفاية من حيث الجرعة التى تكافح الآفة . لقد تناولت احدي الدراسات في عام ١٩٩٧ التأثـــيرات الســـامة لخليط Bt في شبيه الطفيل c.plutella على الحشرة p.xylostella. الـــتداخل بيـــن الاثنين لم يؤثر بشكل معنوي كبير على الموت للحشرة المقاومة للباسيلليس Bt لذلك تاثرت المجاميع الحساسة بالخليط بدرجة اكثر من شبيه الطفيل او Bt منفردة. لم تثبـــت اية دراسات في المعمل او الحقل تطور مقاومة باستخدام بكتريا Bt والعدو الطبيعي معـــا. كما ذكرت سابقا فان المقاومة لبكتريا Bt لم تظهر تكاليف محسوسة. اذا كان العدو الطبيعـــي يهاجم الآفات الحساسة والمقاومة او يفضل الآفات الحساسة فانها قد تسرع من تطور المقاومة عندما تستخدم مع بكتريا Bt.

الجـــرعة العالية High dose: استراتيجية استخدام الجرعة العالية وضعت على امل ان تخفـــض المقاومـــة باستخدام جرعة عالية بما فيه الكفاية من التوكسين لقتل الحشرات غير

المتجانســة وهــي الــتى تملك الليلات لكلا المقاومة والحساسية. الحشرات ذات الالليلات المقاومــة بها درجات مختلفة من المقاومة تعتمد على ما اذا كانت تحمل واحد او اثنين من اللــيلات المقاومــة. من الناحية النظرية فان الجرعة العالية المتزايدة من التوكسين سوف تقــتل حتي كل الافراد التى تكون فيها المقاومة متجانسة. الجرعة العالية بما يكفي لتكون قاتلة ١٠٠% ليست في الحسبان او ليست ذات جدوي. لذلك فان الجرعة العالية من ضمن اســتراتيجية تستهدف قتل الافراد غير المتجانسة (وكذلك تقتل الافراد المتجانسة ذات الليل الحساســية). ان نجــاح استراتيجية الجرعة العالية يعتمد على الليلات المقاومة النادرة او المتنحــية او المتنحــية جزئــيا (Haung واخرون ١٩٩٩). السيطرة على الجرعة بعناية يعتــبر مفتاح هذه الاستراتيجية. اذا كانت الجرعة قابلة للانهيار فان الافراد الغير متماثلة وراثــيا heterozygotes سوف تستمر في الحياة وتمر من على جين المقاومة. بالاضافة الــى ذلــك فان الافراد غير المتجانسة هذه ليست لها ميزة عن الحشرات المتجانسة وراثيا فيما يخص الليلات الحساسية او ان تطور المقاومة قد يسرع (curtis ١٩٨١). من الناحية التطبيقــية فان استراتيجية الجرعة العالية يجب ان تدمج مع استراتيجية المأوي لتقديم افراد حساســة تتزاوج مع الافراد المقاومة التى تبقي بعد استخدام الجرعة العالية. بالاضافه الى ذلــك فان استخدام خليط من التوكسينات سوف يساعد في تاخير المقاومة لاحقا. اعتبارات المشــاكل المرتبطة باستراتيجيات المأوي و خليط التوكسينات يجب ان تؤخذ في الحسبان خاصة عندما تستخدم في خليط مع استراتيجية الجرعة العالية(Foutos واخرون ١٩٩٩).

المقاومــة بشكل عام وجدت ترجع الى صفة وراثية متنحية او متنحية جزئيا ولو ان بعــض الادلــة اوضحت ان بعض الليلات المقاومة قد تكون سائدة او شبة سائدة. اظهرت احــد الدراسات ان المقاومة للمستحضر البكتيري دايبيل ES وهو مستحضر رش لبكتريا Bt يستخدم توكسينات تحت النوع Berliner انه يرجع لصفة سائدة غير كاملة في حشرة O.nubilalis (Huang واخــرون ١٩٩٩). هــذا الدليل يقوض فائدة استراتيجية الجرعة العالية. لم يتحصل على نتائج متشابهة مع دراسات المقاومة للنباتات المهندسة وراثيا والتى تســتخدم توكســينات مخــتلفة (Tabashnik واخــرون ٢٠٠٠). هناك مشكلة اخري مع اســتراتيجية الجرعة العالية تتضمن الاعداء الطبيعية. اذا حدث منع او تخلص مؤقت من مجاميع الآفات فان الاعداء الطبيعية في النظام البيئي التى تتغذي على هذه الآفات ممكن ان تغــادر المكــان او تمــوت. هذا يترك موقع ومتسع فوران الآفة الثانوية عندما تعود الآفــات ولا يــتم السيطرة طبيعيا على الآفات بصورة طبيعية بواسطة الاعداء الطبيعية (Hoy ١٩٩٨). لتحقــيق الجــرعات العالــية يصــبح في الامكان تطوير تخليق وتحفيز

توكسينات Bt. لقد درست طريقة حديثة تضمنت التعبير بالتوكسينات في اجزاء مختلفة من الخلـية. مـع نـباتات الدخان التى هندست وراثيا للتعبير عن توكسينات cryII Aa2 في الكلوربلاسـت حـدث خفـض كبـير في المقاومة في مجاميع ثلاثة انواع من الحشرات. اظهرت مقاومة كبيرة للتعبير النووي الخاص cry II Aa2 (Kota واخرون ١٩٩٩).

المصائد النباتية Trap plants:

استراتيجية المصائد النباتية تشابه لحد ما سياسة المأوي refugia ولكنها تختلف من الناحـية الـنظرية ومن ثم توضع في مرتبة خاصة بها وحدها. لقد طور اندو والستاد هذه النظرية عام ١٩٩٥ باستخدام نظم المحاكاة بالحاسب الالى عن سلوك O.nubilalis. هذه الاسـتراتيجية تستخدم النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt وليس مستحضرات الرش. يتم زراعـة جزء من نبات الـ Bt كمصيدة ويزرع بالقرب منه نفس المحصول العادي بدون هندسـة Bt. النـبات المهندس وراثيا بالبكتريا يزرع مبكرا وينضج مبكرا عن المحصول العـادي ومـن ثـم يجذب الحشرات والتي تقتل حينئذ بواسطة التوكسين. بعد ذلك ينضج المحصـول مـتاخرا ولكـن يكون قد تم مكافحة الحشرات فعلا بواسطة مصيدة Bt. هذه الاستراتيجية تلائم حشرة o.nubilalis لان الفراشات تخرج في يونيو عندما يكون النبات فـي اولـي مراحل نموه المبكرة بعد البيات الشتوي كيرقات كاملة. في هذا الوقت تفضل الفراشات النباتات الناضجة المتاحة حتي تضع البيض وفي نفس الوقت تعتبر هذه النباتات كمصائد. لسوء الحظ فان محاكاه الحاسب الالي بانواع بخلاف هذه الحشرة O.nubilalis اظهـر فشل هذه الاستراتيجية. لقد اتضح ان هذه الاستراتيجية غير ناجحة مع الانواع مثل دودة اللـوز الامريكية H.virescens كما ذكر سابقا بسبب انها تتجنب النباتات المهندسة ببكـتريا Bt عـندما يكـون لديها فرصة الاختيار بين النباتات ذات التوكسينات والاخري الخالية منها (Frutos واخرون ١٩٩٩).

<u>الاصدارات الجارية عن ادارة التعامل مع مشكلة المقاومة:</u>

الاصـدارات الجاريـة المسـتخدمة حاليا: بعد الاستعراض الوافي من خلال الوثائق عن الموضـوع الصادرة من وكالة حماية البيئة الامريكية EPA اتضح بجلاء ان استراتيجيات ادارة المقاومـة تركـز وتهـتم بالنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt وليس مستحضرات الـرش. لقـد زاد الاهتمام بالموضوع اكثر بسبب الطبيعة الثابتة للتعرض للتوكسين الذي

تاخذة الحشرات من النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt والتي تنتج التوكسين خلال موسم النمو. بالاضافة الي ذلك فان جينات Bt علي عكس المستحضرات تطور وتنتج في معامل خاصة ومن ثم تعتبر جزء من اهتمام العامة وتحتاج لحماية اكثر (USEPA ١٩٩٩-أ). البرامج الجارية للادارة الخاصة بالمقاومة تركز علي الاستراتيجية المشتركة جرعة عالية/مأوي والتي عادة تستخدم بالاشتراك مع تكدس الجين. في بعض الاحيان تستخدم استراتيجيات الموزايك او الدورات في المكان او كماوي. لقد نشرت EPA مقاييس جديدة قياسية للمحاصيل البكتيرية Bt مثل مونسانتو وديكالب. بالنسبة للذرة المهندس وراثيا Bt field corn في موسم النمو ٢٠٠٠ اوصت وكالة EPA ان تكون مساحة المأوي ٢٠ % من المساحات التي لا ينمو فيها القطن البكتيري Bt cotton. في المساحات التي ينمو فيها قطن الباسيلليس يكون من الضروري ترك ٥٠% من المساحة كماوي. مساحة المأوي يجب الا تعامل باي مبيد حشري. هذا المطلب يمكن ان يعدل او يغير تحت حدود اقتصادية حرجة معينة. عند هذا الحد الحرج يكون مسموح للزراع باستخدام مبيد حشري غير بكتيري في اماكن ومساحات المأوي مما يؤدي الي استراتيجية الادارة اكثر قربا وشبيهته بالموزايك. بالاضافة الي التشريعات الخاصة بحجم ومعاملة اماكن المأوي قامت الوكالة EPA بتوصيف مكان الماوي. اماكن المأوي الخارجية غير المعاملة يجب ان تكون في نطاق نصف ميل من حقل الباسيلليس Bt اما اماكن المأوي الخارجية المعاملة يجب ان تكون في نطاق ربع ميل من حقل بكتريا الباسيلليس. قد يفضل المزارعون زراعة نباتات المأوي كشرائط strips داخل حقل الباسيلليس. يجب ترتيب الشرائط البكتيرية Bt مع الشرائط غير البكتيرية بالتبادل كل ٦ خطوط(اندرسون ١٩٩٩). القرارات الخاصة بوضع مكان المأوي او نباتات المأوي داخل الحقل او خارجة يمكن ان تتخذ بناء علي ما هو معروف عن عادات الحركة والانتقال وسلوك التزاوج للانواع المستهدفة (EPA ١٩٩٩). بعض الاصناف الخاصة من الذرة المهندسة وراثيا ببكتريا Bt التي تنتج توكسين cryIAc لا يمكن زراعتها في المساحات التي ينمو فيها القطن البكتيري Bt الذي يستخدم نفس التوكسين. هذا بسبب بعض النواحي الخاصة عن تطور المقاومة في دودة كيزان الذرة وهي الآفة التي تستهدف كلا القطن والذرة واحيانا في نفس موسم النمو (EPA ١٩٩٩-ب). الذرة السكرية Bt لا تحتاج لمتطلبات تركيبية خاصة بالمأوي حيث ان الحصاد المبكر لهذا المحصول يقلل من وجود اليرقات المقاومة في الحقول بشكل مؤثر (EPA ١٩٩٩-أ).

علي نفس المنوال فان مزارعي البطاطس المهندسة وراثيا Bt يجب ان يزرعوا ٢٠ % مــن المساحة كمأوي. كذلك ينصح الزراع بزراعة بطاطس Bt في حقول بعيدة بقدر الامكــان عــن المواقع السابقة لحقول البكتريا Bt. اماكن المأوي مع القطن البكتيري اقل تحفظا حيث ينصح بمساحة مأوي ٤% غير معاملة او ٢٠% مساحة مأوي تعامل. اذا كان المزارع يعيش داخل مساحة تمثل زراعات القطن البكتيري ٧٥% من اجمالي القطن يكون علية زراعة الماوي في نطاق ميل حقول البكتريا Bt (US EPA ١٩٩٩ أ). هناك جدل كبــير حــول هذه المتطلبات حيث ان القطن البكتيري يستهدف ثلاثة افات هي دودة براعم الدخــان ودودة اللوز القرنفلية وديدان اللوز الامريكية. جرعة التوكسين التي تنتج بواسطة النــبات تكــون عالــية بما فية الكفاية تقتل كل حشرات ديدان براعم الدخان ودودة اللوز القرنفلــي غــير المتجانســة ولكــن يكون مساوي لجرعة متوسطة في حالة ديدان اللوز الاخــري. بدون حماية المقاومة عن طريق جرعة التوكسين العالية فان ديدان اللوز سوف تفقد حساسيتها سريعا لبكتريا Bt. العديد من التشريعات الواعدة لادارة هذه المشكلة خاصة مع القطن البكيري مطلوبة.

بالاضــافة لما ذكر اعلاه يلجأ بعض الفلاحين الي استراتيجية الدورات rotation strategy ولكــن هذا غير مشرع او مطلوب. الدورات يمكن ان تعتمد علي تبديل اصناف الهجين من نفس المحصول او زراعة محاصيل مختلفة مع بعضها (Benbrook ١٩٩٩). المحاصــيل التبادلــية مقــبولة في الدمج مع الاستراتيجيات الاخري في تشريعات الوكالة EPA التــي ذكــرت قــبلا ولكنها لا تعتبر كافية لوحدها. متطلبات المأوي اصبحت اكثر صــرامة علــي امــتداد الوقت كلما تعلمنا شيئا حول تاثيرات الاستراتيجية علي المستوي الكبــير – بعــيدا عن نماذج الحاسب الالي ، المعامل ، القطع التجريبية الصغيرة حيث تم تصــميم اماكــن المأوي للمرة الاولي. الخطط المستقبلية تستهدف العمل في اتجاه مقاييس تقيــيد قياســية. ذلــك ان الوكالــة EPA تخطط لمواصفات اضافية لمزارعي البطاطس البكتــيرية Bt والــتحديد الكمــي للمسافة التي يجب ان يبعدها المأوي من حقل التوكسين والمســافة التي يزرع عندها محصول البطاطس البكتيري في سنة ما بعيدا عن محصول البطاطس Bt من السنة السابقة. الخطط المستقبلية للوكالة EPA لمزارعي القطن تشمل ٦ -١٠% مســاحات مــاوي اكبر ولكن مساحة الماوي قد تظل تعامل بمبيدات حشرية غير بكتيرية مما يجعل هذه الاستراتيجية اكثر في اتجاه الموازيك.

اصدارات التعليم والمسايرة Education and compliance issues

أي استراتيجية لادارة المقاومة يمكن ان تنجح اذا تم غرسها وتنفيذها بشكل مناسب. مـــن غير الانصاف القول ان المزارعين يفهمون استراتيجيات المقاومة، ماذا توصي به او تمـــنعه وكالـــة حمايـــة البيـــئة الامريكية EPA، وكيف تستطيعون تتبع والعمل مع هذه التكتيكات. استكشاف التطبيقات العملية والتعليم متروكة لمنتجي بكتريا Bt حيث ان الوكالة لا تملـــك المصادر لاستكشاف كل مزارعي النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt. بعد ذلك يقـــوم المنتجون بكتابة تقارير عن المواكبة او المسايرة للوكالة EPA. الاستخدام الخاطئ للمـــأوي شـــاع كتابتة او التشكيك فية. بعض اماكن المأوي التي يقصد الا تعامل يتم رشها بالمبـــيدات الحشرية. نجاح المأوي يقوم بواسطة المزارعين الذين يزرعونها في اراضيهم الفقـــيرة ويعطونهـــا عـــناية اقـــل عـــن النباتات الاخري مما يجعلها اقل جذبا للحشرات (USEPA ١٩٩٩–ب). زراعـــة المحاصـــيل البكتـــيرية حتي مع عدم الحاجة اليها تمثل مشكلة. الذرة البكتيري Bt كمثال يقدم الحماية ضد ثاقبة الذرة الاوربية. الاصابات الوبائية والفوران الشديد لتعداد الآفة هذه يحدث مرة واحدة كل خمسة سنوات بسبب صعوبة التنبؤ بمـــيعاد حـــدوث الوبـــاء فان بعض المزارعين يزرعون النباتات البكتيرية Bt كذلك وفي الغالـــب. بعـــض المزارعين اشاروا ان العوامل الوراثية المطلوبة في الذرة تتوفر فقط في الاصناف المهندسة بالباسيلليس Bt ومن ثم يقومون بزراعة النباتات الباسيلليس حتي لو لم تكن هناك ضرورة للتوكسين.

تعلـــيم الفلاحين لا تحقق نجاحات في كل الحالات حيث من الضروري الحفاظ علي اماكـــن المـــأوي بصورة قياسية. بعض المزارعين اصدروا تقارير تفيد بانهم لم يتلقوا اية معلومـــات تـــتعلق بالحاجـــة للمأوي او سبل زراعتها. البعض الاخر يحدث لديهم تشويش وتعـــارض بيـــن متطلبات الزراعة من قبل منتجي Bt والتي تتطلب حرث السيقان القديمة واتـــباع ارشـــادات ودلائل الحفاظ علي التربة المحلية. من الواقع ان هذه الاقترابات تدعو الـــي الحاجة لتحسين الاتصالات بين الجهات المعنية. يجب تعليم الفلاحين كذلك عن كيفية استكشاف المحاصيل المزروعة لتحديد نجاح او فشل النباتات المهندسة وراثيا .

الاستنتاج وخلاصة القول: ما ذكر اعلاه يشير الي اهمية الاستراتيجيات الخاصة بايقاف او مجابهة او التغلب علي او تفادي ظهور المقاومة لفعل وسائل المكافحة الحيوية خاصة الميكروبية بالباسيلليس. الحق يقال انني قد استمتعت وتعلمت كثيرا من هذا التناول لانها احتوت علي طرق واقترابات جديدة عقلانية تم عن فكر متفتح. لا غرابة في ان دراسة هنا واخري هناك اشارت الي جوانب الفشل التي تصاحب كل من هذه الاستراتيجيات. لم تسلم أي دراسة من القول بان الظروف الحقلية وما يحدث فيها غير ممكن التنبؤ به كما لا توجد معلومات كافية عن سلوك الآفات بما يؤكد تواكبها مع النماذج التي نحن بصددها. لقد اجريت بحوث كثيرة في اتجاه وراثة المقاومة وسلوك الآفة في النظام البيئي وتكرارية الليلات المقاومة في المجاميع الطبيعية والمقاومة المشتركة للتوكسين وحتي التاثيرات الاقتصادية لهذه الاستراتيجيات. مع هذا فما زالت المعلومات المتوفرة لا تقدم ضمانات كافية او حتي امكانيات نجاحات التنبؤ بما سوف يحدث في الحقل. في هذا المفهوم فانة لا احد في الاستراتيجيات الموضوعة وحتي المستخدمة فعلا لقت القبول الكامل اذا كنا معنيين حقا بالحفاظ علي بكتريا Bt كوسيلة امنة وفعالة في مكافحة الحشرات.

مشكلة المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا Bt:

يمكن استعراض العديد من الفوائد والمميزات من جراء استخدام النباتات المهندسة وراثيا. اول الفوائد تقليل العمالة وما يتبعها من تكاليف والتزامات صحية واجتماعية ومادية لان المستحضر البكتيري ليس في حاجة لتكرار الاستخدام مرات عديدة خلال الموسم. كذلك يقل كثيرا تاثيرات الظروف الجوية علي المبيد كما ان الاجراء النباتية التي لا يمكن الوصول اليها بالرش علي المجموع الخضري كما هو الحال في داخل السيقان النباتية سوف تغطي بالمبيد. من اكثر الفوائد التي تثير الاهتمام: تغطية كل النبات كما ان التوكسين ينتج في الموسم المطلوب فقط (Monsanto ٢٠٠٠). اذا تكونت المقاومة فلا تكون هناك فوائد ولا مميزات بل العكس هو الصحيح تماما. كما تاكد من متطلبات استمرار زراعة نباتات المأوي يصبح من الصعوبة البالغة تعويض التلف والضرر الذي يحدث في فاعلية التوكسين من جراء استمرار تعرض الآفات والبيئات التي تعيش فيها للتوكسين. بالاضافة الي ذلك فان هناك نقطة عندها لا يمكن للمزارعين قبول الفقد والخسارة في الانتاجية المحصولية التي تنتج من زراعة نباتات ومساحات المأوي. ايقاف الفقد المحصولي من جراء السماح بمعاملة نباتات المأوي بالمبيد ليست هي الاجابة عن هذا التساؤل لانها توقف او تنقص فقط من المجموع المتاح من الحشرات الحساسة لبكتريا Bt. الاستراتيجية الحكيمة او الاكثر حكمة لادارة المقاومة ليست مجرد محاولات لتقديم

حشـــرات حساسة والتي قد تختار او لا تختار التزاوج مع الحشرات المقاومة ولكن خفض تعـــرض كـــل الحشـــرات للتوكســـين لتقليل الضغط الانتخابي بقدر الامكان مع استمرار المحافظة علي وسيلة مكافحة الآفات فعالة.

المنتجات الجارية الان المهندسة وراثيا ببكتريا Bt لا يبدو انها تمثل جزء من الحل لمشـــكلة ادارة التامل مع ظاهرة المقاومة. هناك حلين متاحين يتضمنا وجود توكسينات Bt عـــند الحاجة فقط. احد الحلول تتضمن الهندسة الوراثية المتقدمة للنباتات والاخري يتضمن هندسة وراثية اقل للنباتات. احد الحلول يتمثل في التعبير عن وقت معين time-specific expression. كمـــا ذكـــر اعلاه عن هذه الطريقة فانة لا توجد طريقة في الوقت الراهن تســـتطيع التعبـــير بالتوكســـين في وقت محدد ومعين. افضل توقيت للتعبير عن التوكسين ســـوف يكون في الانسجة التالفة او المعرضة للضرر فقط. النباتات الغير مضارة بالآفات ســـوف لا تنـــتج توكسينات. التعرض للتوكسين سوف يحدث فقط عندما يكون ضروريا. الحل الاخر يتمثل في استخدام الباسيلليس Bt كرش للمجموع الخضري فقط. فوائد النباتات المهندســـة وراثيا بالباسيلليس ليست كافية لاحداث تعرض زائد للتوكسين. بكتريا Bt تكون فعالـــة فقـــط عندما تستخدم بالشكل المناسب في الرش. بسبب التخصص الشديد للباسيلليس فانهـــا ليست في حاجة للافراط في الاستخدام وفي الحقيقة فانها تكون افضل اذا لم تستخدم النـــباتات المهندســـة وراثـــيا بمـــا يقلل او يوقف العمالة. المزارعين عليهم ان يستخدموا التوكســـين فقـــط عند حدوث او يكون هناك احتمالات كبيرة لحدوث اصابات وبائية وتلف كبـــير اقتصادي من الآفات المستهدفة وكذلك في المساحات التي يحدث فيها الضرر فقط. لقد نجح زراع الزراعة العضوية وهؤلاء الذين يزرعون في المساحات الصغيرة باستخدام هذه الطريقة لسنوات.

المستقبل The Future:

البحوث المستقبلية سوف تركز علي سد الفجوة المعلوماتية كما ذكر سابقا خاصة ما يتعلق بسلوك الآفة وخصائص مقاومة الحشرة التي لم نفهمها حتي الان. هذا سوف يؤدي الـــي بـــرامج مجابهـــة المقاومة اكثر عقلانية. يجب اخذ وتوخي الحرص والعناية بجعل الفلاحيـــن والمزارعيـــن علي دراية كاملة بتفاصيل برامج المقاومة هذه وماذا يفعلون حتي يتاكدوا من ان زراعاتهم تتوافق مع هذه البرامج. يجب ان تستمر البحوث في اتجاه التعبير بالتوكســـين فـــي وقت او اوقات معينة. الدمج مع البحوث الخاصة بالسلوك والمقاومة في الحشـــرة ســـوف يســـاعد في اتخاذ القرار ما اذا كان التعبير الزمني اسلوب ناجح لايقاف المقاومـــة. بســـبب عـــدم وجود طرق حتي الان للتعبير عن Bt فقط عندما يحدث ضرر

للانســجة فانــنا مازلنا في حاجة لمزيد من الدراسات والبحوث في هذا الاتجاه. ان فهم ما هــية الباســيلليس ثورينجنســيز يساعد في محاولات ايجاد اكثر من نوع من البكتريا التي يكــون لها نفس الاستخدامات في الزراعة. هناك بكتريا اخري في التربة تماثل خصائص الباســيلليس Bt فــي الصــفات الابادية للحشرات. ان الكشف عن بكتريا اكثر ذات فعالية وامان علي غرار Bt او الكشف عن فرق لغرس وادخال البكتريا المتاحة الان كمبيد فعال سوف تكون من حسن الطالع وتاكيد للامان في المستقبل وتامين هذا المستقبل عندما تتطور المقاومة لبكتريا Bt.

خلاصة القول ان التكنولوجيا الحيوية يمكن ان تستخدم لصالحنا او ضدنا في برامج ادارة المقاومــة. البحوث المستقبلية سوف توضح لنا أي طريق نسلك في نفس الوقت يجب ان تكــون وكالة حماية البيئة الامريكية EPA ومنتجي بكتريا الباسيلليس Bt والمزاريعن متحفظيــن ومتوخــي الحــذر في خلق وتعضيد والتواكب مع الاستراتيجيات الجارية عن المقاومــة. بكتريا Bt تعتبر مبيد نموذجي وسوف يؤدي فقده الي مأساه كبيرة تدخل في نطاق سوء الحظ.

References

Alstad, D. N. and Andow, D. A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. Science 268: 1894-1896.

Anderson, J. L. 1999. Letter to Bt corn registrant. Available at: http://www.epa.gov/oppbppdl^opesticides/otherdocst.com.ltr.htm

Baum, J. A., Johnson, T. B., and Carlton, B. C. 1999. Bacillus thuringiensis: Natural and recombinant bioinsecticide products. In: Biopesticides: Use and Delivery, Hall, F. R. and Menn, J. J., Eds., Humana Press, Totowa, NJ, 189-210.

Benbrook, C. 1999. EPA 's plant pesticide refuge program: Questions from the Chicago workshop. Available at: http://www.biotech-info.neVmeetmg^report.html.

Caprio, M. A. 1998. Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. J. Econ. Entomol. 91: 1021-1031.

Chilcutt, C. F. and Tabashnik, B. E. 1997. Independent and combined effects of Bacillus thuringiensis and the parasitoid Cotesia plutellae (Hymenoptera: Braconidae) on susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 90: 397-403.

Comins, H. N. 1977. The development of insecticide resistance in the presence of migration. J. Theor. Biol. 64: 177-197.

Croft, B. A. 1990. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. In: Pesticide Resistance in Arthropods, Roush, R. T. and Tabashnik, B. E., Eds., Chapman and Hall, New York, NY, 277-296.

Curtis, C. F. 1981. Possible methods of inhibiting or reversing the evolution of insecticide resistance in mosquitoes. Pestic. Sci. 12: 557-64.

Ely, S. 1993. The engineering of plants to express Bacillus thuringiensis delta-endotoxins. In: Bacillus thuringiensis, An Experimental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons. Chichester, UK, 105-124.

Frutos, R., Rang, C., and Royer, M. 1999. Managing insect resistance to plants producing Bacillus thuringiensis toxins. Critical Reviews in Biotechnology 19: 227-276.

Gould, F. 1998. Evolutionary biology and genetically engineered crops. BioScience 38: 26-33.

Ciould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., and Laster, M. 1997. Initial frequency ofalleles for resistance to Bacillus thuringiensis toxins in field populations ofHeliothis virescens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3519-23.

Gould, J. L. and Keeton, W. T. 1996. Biological Science (6th Ed.) New York: W. W. Norton and Company.

Hone, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

Hoy, M. A. 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353: 1787-95.

Huang, F., Buschman, L. L, Higgins, R. A., and McGaughey, W. H. 1999. Inheritance of resistance to Bacillus thuringiensis toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 284: 965-967.

Iqbal, M., Verkerk, R. H. J., Furlong, M. J., Ong, P. C., Rahman, S. A., and Wright, D. J. 1996. Evidence for resistance to Bacillus thuringiensis (Bt) subsp. kurstaki HD-1, Bt subsp. aizawai and Abamectin in field populations ofPlutella xylostella from Malaysia. Pestic. Sci. 48: 89-97.

Kegley, S.E. and Wise, L.J. 1998. Pesticides in fruit and vegetables. Sausalito, CA: University Science Books

Kota, M., H. Daniell, S. Varma, S. F. Garczynski, F. Gould, and W. F. Moar. 1999. Overexpression of the Bacillus thuringiensis (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt- resistant insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1840-5.

Lereclus, D., Delecluse, A,, and Lecadet, M.-M. 1993. Diversity of Bacillus thuringiensis toxins and genes, hi; Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 37-69.

Liu, Y. B. and Tabashnik, B. E. 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to Bacillus thuringiensis. Proc. R. Soc. Lond B 264:605-10.

Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Patin, A. L., and Bartlett, A. C. 1999. Development time and resistance to Bt crops. Nature 400:519.

Mallet, J. and P. Porter. 1992. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? Proc. R. Soc. Lond. B 250: 165-9.

Macintosh, S. C., Stone, T. B., Jokerst, R. S., and Fuchs, R. L. 1991. Binding of Bacillus thuringiensis proteins to a laboratory-selected line ofHeliothis virescens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8930-8933.

Man-one, P. G. and Macintosh, S. C. 1993. Resistance to Bacillus thuringiensis and Resistance Management, hi: Bacillus thuringiensis. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 221-235.

McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide Bacillus thuringiensis. Science 229: 193-195.

McGaughey, W. H., Gould, F., and Gelemter, W. 1998. Bt resistance management. Nat. Biotech. 16: 144-6.

Michaud, D. 1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. Trends Biotech. 15: 4-6.

Miller, G.T. 1998. Living in the environment (10th ed.). Belmont, CA: Wadsworth

Monsanto. 2000. The whole plant. The whole season. Available at: http://www.monsanto.com/monsanto/agriculture/current_products/yieldgard_ipcom/whole_plant_season.html.

Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., and McGaughey, W. H. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to Bacillus thuringiensis toxins. J. Biol. Chem. 272: 23473-23476.

Pimentel, D., and Burgess, M. 1985. Effects of Single Versus Combinations of Insecticides on the Development of Resistance. Environ. Entomol. 14: 582-9.

Tabashnik, B. E. 1994a. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. Proc. R. Soc. Lond. B 255: 7-12.

Tabashnik, B. E. 1994b. Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis. Annu. Rev. Entomol. 39: 47-79.

Tabashnik, B. E. 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. Proc. Natl. Sci. USA 94: 3488-3490.

Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Finson, N., Masson, L., and Heckel, D. G. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four Bacillus thuringiensis toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1640-1644.

Tabashnik, B. E., R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2000. Resistance to Bt toxins. Science 287: 42.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K., and Adang, M. J. 1994. Reversal of resistance to Bacillus thuringiensis in Plutella xylostella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4120-4.

Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J. L., and Ferre, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis ofdiamondback moth resistance to Bacillus thuringiensis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12780-12785.

United States Environmental Protection Agency. 1999a. EPA and USDA position paper on insect resistance management in Bt crops. Available at:
http;//www.epa.gov/oppbppdl/biopesticides/otherdocs/bt_position_paper_618.ht m
United States Environmental Protection Agency. 1999b. Meeting summary: EPA-USDA Bt crop insect resistance management workshop. Available at:
http ://www. epa.gov/oppbppd 1 opesticides/summary826.htm.

Van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of Bacillus thuringiensis. .Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle, P. E., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1-35.
Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Bamett, B. D., and van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis. Science 247: 72-74.

Van Rie, J., Van Mellaert, H., and Peferoen, M. 1992. Mechanism of insect resistance to Bacillus thuringiensis in Plodia interpunctella and Plutella xylostella. In:
Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects, Mullin, C. A. and Scott, J. G., Eds., American Chemical Society, Washington, DC.

Wearing, C. H. and Hokkanen, H. M. T. 1995. Pest resistance to Bacillus thuringiensis: ecological crop assessment for Bt gene incorporation and strategies of management, hi: Biological control: benefits and risks, Hokkanen, H. M. T. and Lynch, J. M., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 236-252.

Whalon, M. E. and W. H. McGaughey. 1998. Bacillus thuringiensis: Use and Resistance management. In: Insecticides with novel modes of action: mechanism and application, Ishaaya, I. and Degheele, D., Eds., Springer, Berlin, 106-137.

Wirth, M. C., Georghiou, G. P., and Federici, B. A. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of Bacillus thuringiensis to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, Culex quinquefasciatus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10536-40.

اقوال مأثورة عن ادارة مقاومة الآفات : دراسة حالة عن البطاطس – Bt

- هـل يمكـنك تخيل نبات ينتج بروتينه الذاتي القاتل للحشرات مع تخصص عالي وامان بيئي متميز؟
- هـل يمكـنك تخيل ان هذا البروتين الغذائي الامن قد تحصل عليه في الاصل من بكتريا شائعة في التربة وليس من النبات؟

هذا ليس خيال علمي ولكنه حقيقة علمية مؤكدة.........

فـي ابريل ١٩٩٥ قامت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA بتسجيل ثلاثة مبيدات نباتية من جراء الهندسة الوراثية للنباتات بما يجعلها قادرة علي انتاج بروتين الاندوتوكسين لبكـتريا الـتربة باسـيلليس ثورينجنسيز (Bt). لقد كانت نباتات البطاطس والذرة والقطن والطمـاطم مـن اول النباتات المنتجة للمبيدات التي طورت من خلال وسائل التكنولوجيا الحـيوية وتـم تسـجيلها مـن قبل الوكالة طبقا للتشريعات في هذا الشأن. الذرة السكرية البكتـيري Bt فـي الطـريق الـي التسويق التجاري. في عام ١٩٩٧ تم زراعة حوالي ٤٠,٠٠٠ اكـر من البطاطس المنتجة لاندوتوكسين الباسيلليس Bt بهدف الانتاج التجاري. لقد كانت الآفة المستهدفة خنفساء كلورادو البطاطس وهي من اخطر افات هذا المحصول الهـام. لقد كان المستهدف زراعة من ٥٠ وحتي ١٠٠ الف اكر بحلول ١٩٩٨. بالاضافة الـي البطاطس كان متوقعا ان تصل مساحة القطن البكتيري Bt الي ٢ مليون اكر والذرة البكتـيري Bt الـي ملـيون اكر في عام ١٩٩٨. لقد توقع الكثيرين وتنبأوا بان استخدام النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt سوف تقلل بشكل كبير ومعنوي من استخدام المبيدات المخلقة علي هذه المحاصيل الاقتصادية. مع هذا ظلت هذه الاستراتيجية محل نقاش وجدل كبيريـن بسبب العديد من المشاكل والاعتبارات التي لم يمكن حلها او الاتفاق عليها خاصة ومـا يقـال من ان التوسع في استخدام النباتات البكتيرية Bt سوف يزيد ويحفز من تطور عـدم الحساسـية لوسيلة المكافحة بين الآفات الحشرية المستهدفة. هذه مخاوف في محلها ارجو توضيحها فيما بعد......

العلم يزودنا بالدليل عن معدلات المقاومة في الآفات

حديـثا اظهـرت تقاريـر تقويم المخاطر الاحتمالات الكبيرة عن مقدرة الحشرات لتكويـن مقاومة سريعة من جراء التكيف والتعود علي توكسينات بكتريا Bt. لقد وجد ان اعـداد كبـيرة من الحشرات في المجاميع المدروسة تملك مقاومة وراثية للباسيلليس. مع

التعرض المستمر لمستويات عالية من توكسين البروتين في النباتات البكتيرية Bt فان صور المقاومة سوف تستمر في البقاء ويحدث فيها تهجين بيني. هذا التهجين الداخلي او البيني سوف يزيد ويرفع من مقاومية الآفة للصور المتاحة من بكتريا Bt ومن خلال المقاومة المشتركة قد تمتد العملية الي صور اخري من بكتريا Bt لم تطلق بعد. لقد وجد ان آفة براعم الدخان (Heliothis Virescens) ذات مقاومة وراثية في واحد من مجموع ٣٥٠ فرد تم جمعها من حقول القطن. هذا المردود يوضح مقاومة عالية بعيدة كثيرا عما تنبأ به البحاث مبكرا من خلال النماذج النظرية. لقد تنبأ الخبراء بحدوث دورة دوام مدتها ٣-٤ سنوات للنباتات البكتيرية Bt المزروعة حتي مع طرق ووسائل ادارة التعامل مع المقاومة الجارية حاليا.

ادارة مقاومة الآفات Pest Resistance Management

الاستراتيجيات لتحقيق الحصول علي نباتات تتحمل او تقاوم مبيدات الحشائش او الآفات الحشرية والممرضات مثل الفيروسات والبكتريا والفطريات والنيما تودا والنباتات الطفيلية من خلال التكنولوجيا الحيوية لاقت اهتمام متزايد بسبب كفاءتها العالية في خلق عدم حساسية للافات. عدم الحساسية هذا او المقاومة المكتسبة تاكد وسجل وثائقيا مع كل من المبيدات الحشرية الكيميائية وصفات المقاومة النباتية والتي تنتج من عامل وراثي فردي سائد. لقد تم تطوير استراتيجيات جديدة للحفاظ وصيانة مجموع الآفة بحيث تستمر حساسة لوسيلة المكافحة. هذا عنصر ضروري جدا في غرس هذه التكنولوجيات الجديدة وادخال هذه المنتجات للحفاظ او بما يحافظ علي فعاليتها علي امتداد سنوات عديدة. بالنسبة للمحاصيل المنتجة لبكتريا Bt تتضمن استراتيجيات مقاومة الآفة النواحي التالية:

١- انتاج عالي لبروتين التوكسين في النبات لقتل الأفات الحساسة جميعا والنادرة من غير الحساسية.

٢- ملاذات النباتات الخالية من بكتريا Bt والتي تسمي المأوي refugia لصيانة تربية وتكاثر المجموع الحساس لبكتريا Bt من الآفة . هذا المجموع سوف يزيد في العدد عن الافراد غير الحساسة ومن خلال التزاوج سوف يمنع بشكل فعال تطور وزيادة مجموع الافراد ذات المقاومة العالية.

"قبل مناقشة مميزات هذا النظام من إدارة المقاومة بالتفصيل سوف نسترجع بعض الحقائق والأساسيات عن المبيدات الحشرية البكتيرية Bt"

ما هو توكسين بكتريا الباسيلليس What is Bt-toxin؟

توكسين – Bt من منتجات ادارة مكافحة الآفات المعروفة جيدا للمزارعين ورجال البساتين خاصة مسئولي الحدائق المنزلية بداية لمكافحة الآفات الحشرية من رتبة حرشفية الاجنحة مثل قافزات الكرنب ودودة ثمار الطماطم. العديد من صور Bt – توكسين تم تسجيلها من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لمكافحة انواع عديدة من الآفات الحشرية. هذه المنتجات الحديثة للتهجين المبني علي التكنولوجيا الحيوية كما ذكر قبلا كانت محورة وراثيا لانتاج البروتين البللوري لبكتريا Bt القاتل للحشرات والذي يستخدم عادة علي النباتات في صورة مسحوق محبب خلال مرحلة النمو العادي للنباتات. لقد استخدمت مستحضرات البكتيريا Bt بشكل فعال في حقول انتاج الخضراوات بما فيها حقول الزراعة العضوية لما يزيد عن ٤٠ عاما. المبيدات الحشرية التي تعتمد علي Bt معروفة جيدا من منظور الامان البيئي وعدم وجود ايه تاثيرات سامة علي الثدييات. تنشيط التوكسين يتطلب ظروف قلوية توجد في معدة الحشرة عما هو الحال مع الظروف الحامضية الموجودة في السوائل المعدية في الثدييات. بالاضافة الي ذلك فان توكسين – Bt يتكسر بسرعة في البيئة ويتحول الي مركبات غير سامة. هذا التدهور السريع بواسطة الاشعة فوق البنفسجية UV كمثال حدث من الثبات والفاعلية لمحول رش البكتريا Bt. تحقيق ثبات توكسين – Bt بانتاجه داخل خلايا النباتات يعتبر من احد الفوائد لهذه الاصناف النباتية الجديدة المهندسة وراثيا.

الان توجد اصناف بطاطس متاحة علي المستوي التجاري تنتج في خطوط الانتاج Newleaf TM من شركة Nature Mark وهو قسم من مؤسسة .Monsanto crop واسماء هذه الاصناف اتلانتك، سوبيريور، راسيت بيربنك وهي قادرة علي انتاج بروتين توكسين الباسيلليس Bt وراثيا. هذه الاصناف المنتجة للمبيد الحشري داخلها تعتبر امنة بوجه عام وكذلك ذات فاعلية عالية ومتوافقة بيئيا. الفاعلية طويلة المدي للنباتات المهندسة او المحورة وراثيا للحماية ضد العديد من الآفات الضارة مثل خنفساء كلورادو البطاطس سوف تعتمد علي العناية والحذر في برامج الادارة للمقاومة في الآفات تجاه هذه الوسائل الفعالة والتنمية. ان الكفاءة نحو التطور السريع لعدم الحساسية تجاه مستحضرات الرش لمكافحة الآفة او النباتات التي تنتج المبيد الحشري تاكدت بشكل عريض من عائلة كبيرة من بروتينات Bt ومبيدات الحشائش واستراتيجيات التعامل وادارة المقاومة للفيروسات

وغيرها من الكيميائيات والعوامل الوراثية. لقد اتفق الخبراء علي ضرورة توفير معلومات اكثر عن استراتيجيات ادارة المقاومة لحماية الانجازات التي تحققت مع البطاطس المنتجة لتوكسين بكتريا Bt وكذلك المستحضرات التقليدية للباسيلليس التي تستخدم رشا علي النباتات. مع منع تطور المقاومة بواسطة الآفات للبروتينات التي تنتج داخل النباتات سوف تستمر المكافحة الفعالة بهذه الوسائل لسنوات عديدة قادمة.

لماذا لاقت البطاطس المهندسة وراثيا ببكتريا Bt مزيد من الاهتمام؟

الوسا للتكنولوجيا الحيوية تستخدم لادخال صفة مسولة عن مكافحة الآفة او صفة تحقق تحمل النبات لفعل المادة الكيميائية (كما هو الحال مع مبيدات الحشائش) في النباتات. لقد اجري هذا الاقتراب علي امل تقليل استخدام الرش بالمبيدات الحشرية المخلقة. كبدائل فان الفائدة المشتركة تتمثل في ادخال مواد معتدلة او صديقة للبيئة او مواد تستخدم بجرعات متناهية في الصغر لنحل محل المركبات الحالية التي تواجد الكثير من الاعتراضات والانتقادات. لقد تزايد الاهتمام عما اذا كانت هذه الاستراتيجيات وحيدة الجين والتي هي متاحة في الاسواق علي نطاق تجاري في الوقت الراهن سوف تسبب ان مزيد من الآفات سوف يصبح غير حساس لكلا النبات المقاوم للآفة ولمستحضرات الرش الموجودة الصديقة للبيئة مثل بروتين Bt. المقاومة قد تحدث سريعا بشكل نسبي في الغالب بسبب ان جزء من الآفات في أي مجموع حقلي غير حساس طبيعيا لبعض الكيميائيات والنباتات التي تعتمد علي عوامل وراثية للمكافحة. كذلك فان المقاومة لمادة ما قد تعطي الآفة تحمل للمركبات المرتبطة وهذا يطلق علية المكافحة المشتركة cross-resistance. هذه الصور غير الحساسة للآفة ذات ميزة في البقاء والنمو والتكاثر مع الاستخدام المتكرر للمبيد او زراعة الصنف النباتي المقاوم وراثيا. المجموع غير الحساس يزداد كلما زادت صفات المقاومة (عوامل المقاومة للمبيد الكيميائي او النباتات المقاومة) حتي تصبح مكونة لغالبية المجموع من خلال التربية الاكثر تكرارية. الحشرات غير الحساسة لبكتريا Bt والتي تنتخب من خلال الاستخدام الخاطئ للنباتات المحتوية علي Bt سوف يقلل من قيمة وسيلة ادارة مجابة الآفة بالنسبة لمستخدمي التكنولوجيا وغير مستخدميها.

ماذا يعني ادارة المقاومة في الآفات؟

التطبيقات المتكررة لمبيد مفرد (او نبات به صفة مقاومة الآفة) ذات مقدرة في زيادة وفرة الآفات غير الحساسة للمنتجات التي قدمت حديثا للرش او للاصناف النباتية

المقاومـــة للآفة . مشكلة المقاومة للمبيد في الزراعة التقليدية تعتبر من اخطر الامور وقد قـــدر انه ينفق عليها ٢٥% من كل ما ينفق في امريكا سنويا لمكافحة الآفات . علي عكس مـــا ذكر قبلا في اتجاه قتل الآفات الزراعية فانة قد طورت برامج للحصول علي ملاذات نباتـــية plant sanctuaries يطلـــق علـــيها refugia لصـــيانة مجاميع افات المحاصيل الحساســـة للمبـــيدات. التحدي والتوقع من صناعة التكنولوجيا الحيوية تتمثل في الاقتراب الناشـــئ من دفع السوق لتقليل الآفات المستهدفة لحد حيث تصان ويحافظ علي الفوائد عن طـــريق تكـــامل المنتجات في نظام بيئي زراعي مدار جيدا. المأوي والاستخدام الموسمي المتـــبادل للمحاصيل المحورة وراثيا تعتبر المكونات الرئيسية لهذه الاستراتيجية. في غياب خطـــة مكثفة لادارة المقاومة يزداد قبول النشر العريض لبكتريا الباسيلليس المقاومة (عدم حساســـية الآفـــات الحشـــرية لتوكســـين بروتين Bt) خلال اقل من ٥ سنوات. التجانس المحصـــولي في مساحات كبيرة من العوامل المطلوبة لمجموع الصور غير الحساسة للآفة بمـــا يجعلهـــا تزداد عند هذا المعدل من التنبؤ. افضل الطرق لمنع انتخاب المجاميع غير الحساســـة من الآفة تبقي محل جدل وما يصاحبها من بيانات محدودة صالحة من الحقل. كمـــا هـــو الحال مع أي تكنولوجيا جديدة فانة لا يحقق الفوائد من الاستخدام لفترات طويلة مـــن الزمن مما يستدعي اخذ الاحتياطيات. يستحب ان يكون هناك اقتراب اقليمي للادارة الفعالـــة لمقاومـــة الآفـــات . هذا التوجه يجري في صور علمية مفتوحة من قبل الخاصة والعامة. الاشتراك في هذا التوجه بواسطة رجال البيئة ومجموعات الحفاظ علي المصادر الزراعـــية والعامة ذات تاثير قوي علي التطور التجاري وتسجيل وتسويق النباتات الجديدة التي تنتج بروتين – Bt وبرامج ادارة المقاومة. النقطة الاساسية المحدودة تتمثل في ادارة المعـــدل الـــذي عنده تصبح الآفات مقاومة للمبيد او وسائل المقاومة الكيميائية او الوسائل الحيوية او المقاومة الوراثية من تربية النباتات التقليدية او مقاومة الآفة من خلال التحوير الوراثي علي المستوي الجزئي مما جعل من هذا الاقتراب موضوع زراعي حرج.

ما هي النواحي المحددة الفاتحة في ادارة المقاومة في الآفات؟

الاهتمامات عظيمة واكثر الحاحا بالنباتات المحورة من خلال التكنولوجيا الحيوية بحيـــث تسوق وبها مبيدات تقتل الحشرات او تقاوم الفيروسات او بها صفات تحقق تحمل مبيد الحشائش. الاصدارات الفاتحة تتمثل في النواحي التالية:

- المقاومـــة المشتركة cross-resistance: المقاومة لمركب ما يحدث مقاومة في المركبات المرتبطة به.

- التربـية المشتركة cross-breeding لعوامل المقاومة للنباتات المستوطنة خاصة في مراكز الاصول الوراثية او مراكز الاصول النباتية.
- احتمال زيادة استخدام المبيدات الكيميائية واسعة الانتشار والتي سوقت بالاشتراك مع المحاصيل المطورة بالتكنولوجيا الحيوية.
- اكتساب الصفات الجديدة بواسطة الممرضات التي تكسر المقاومة النباتية الوراثية او التي تحقق عنفوانية جديدة (العنفوانية aggressiveness) او المدي العوائلي.

مع البطاطس البكتيرية – Bt فان احتمال التربية المشتركة للنباتات المتوطنة تعتبر غير واردة بشكل كبير. نوعين من البطاطس المحلي القريبة التي لا تكون درنات والقريبة للـنوع الاصلي سولانوم تيبوروزم وجدت في امريكا. يوجد سولانوم فينوليري ، سولانوم جاميســي. العزل الجغرافي لهذه الانواع القريبة من حقول انتاج البطاطس والعزل اللاحق المتقدم بسبب حواجز التربية ذات الظروف والعوامل الوراثية المشتركة من ضمن المعايير التـي تسـتخدم بواسـطة وكالة حماية البيئة الامريكية EPA بما يسمح بتسجيل النباتات المنتجة للباسيلليس.

من يشرع التعامل مع البطاطس البكتيرية – Bt ويعضد ادارة مقاومة الافات؟

الشـركات الـتجارية وراء البحوث الاكاديمية والمنظمات البيئية والوكالات المحلية والفيدرالـية للتشـريع تعمـل معـا لتطوير افضل استراتيجيات للادارة تحافظ علي كفاءة المنـتجات الموجودة والجديدة المستخدمة في مكافحة الافات. استجابة لبعض الجزئيات في اتجـاه الـتطوير السـريع التجاري للنباتات المقاومة للحشرات من خلال التربية الجزيئية (الهندسة الوراثية) كونت وكالة حماية البيئة الامريكية EPA مجموعة عمل لادارة مقاومة الافـات (PRMW) فـي عام ١٩٨٨. لجنة الخبراء تكونت من ممثلي امراض النباتات، الميكروبيولوجـيا، الحشرات، علوم الحشائش، ايكولوجيا النظم، الكيمياء الحيوية. لقد قامت هـذه اللجـنة بوضع الدلائل العامة ومعايير ادارة المقاومة والخطط اللازمة التي يجب ان تشمل:

١. .معلومات عن بيولوجية وايكولوجية الافة.
٢. استراتيجية فعالة للحفاظ علي المصادر الوراثية للمقاومة.
٣. توصـيات المأوي الفعال (المأوي يجب وبالضرورة ان يكون ملاذ لمجموع الافة الحساسة).

٤. استكشاف تطور المقاومة وتسجيلها في تقارير ومتابعة خطة ايقافها.
٥. ادخال وغرس وتنفيذ استراتيجيات الادارة المتكاملة للافات(IPM) في التوصيات.
٦. برامج الاتصال والتعليم عن استخدامات المنتج المسئول.
٧. الـتعهد بتطوير كيميائيات بديلة او انشطة والاستراتيجيات الوراثية التي تؤخر او تمنع تطور المقاومة للافة.

الاستراتيجيات التـي تعتمد علي المحصول والافة تمثل افضل الاقترابات الجارية والمعـروفة والعملية للحفاظ علي دوام المبيدات المبنية علي بكتريا Bt لكل واحد. تخفيض بعـض عناصر الخطة تبقي لحد كبير بدون اجابة حتي تتولد خبرات من جراء الاستخدام الواقعي وتشمل:

- تصـميم وادارة المـأوي (النظام المناسب ، النسبة مع المحصول البكتيري Bt ، خاصـة مسـافات وضـع وتنفيذ حقل المأوي من المحصول البكتيري – Bt... للاسـف الشديد غير مفهومة. لقد ادت اراء الخبراء الي الاقتراح بان علي الاقل ٢٥% مـن النباتات غير البكتيرية في نظام الشرائح يجب ان يتبع ولكن الوضع الجاري يمثل اقل قليلا من ٤% مأوي).
- معدلات مقاومة المبيد – انتخاب الجين بين الافات تحت الظروف الحقلية.
- التباين في مستويات انتاج بروتين الباسيلليس – Bt تحت ظروف الاجهاد الحقلي (استراتيجيات الجرعة العالية لقتل الكل ولكن معظم الافراد المقاومة ، يعتقد انها مطلوبـة لـلادارة الفعالة لمقاومة الافات. البطاطس البكتيرية تم هندستها وراثيا لتحقـيق واطـلاق جرعة عالية. الظروف الحقلية والبيئية التي تحفز النباتات قد تـؤدي الـي تحقـيق جرعة عالية عما هو متوقع. هذا قد يسرع من تطور عدم الحساسية بين مجاميع الحشرة).

كيف برز الاهتمام بنواحي امان الغذاء؟

لقد تم تسجيل ما يزيد عن ١٧٦ منتج – Bt مختلف للاستخدام التجاري منذ ١٩٦١ . لـم ينشـر مـا يدل علي حدوث سمية غذائية لانواع الفقاريات (الثدييات – الاسماك – الطيور). اظهرت دراسات التناول ان بروتين – Bt يهدم ويتكسر في سوائل معدة الثدييات (احمـاض وانـزيمات الهضـم) خـلال اقل من ٣٠ ثانية. لا يعرف حدوث اية تفاعلات حساسـية من بروتينات الباسيلليس. بروتينات – Bt لا تحتوي علي الصفات الشائعة لاي

مسبب للحساسية. علي عكس معظم مسببات الحساسية المعروفة فانها تفقد فاعليتها بواسطة الحرارة والاحماض والانزيمات المحللة للبروتينات. كذلك فانها لا تتحور بشكل خاص بواسطة النبات (لا يحدث لها جليكوسلة) وتوجد في تركيزات منخفضة نسبيا. بروتينات Bt سواء علي صورة مستحضرات للرش او تنتج بواسطة النباتات تعتبر شديدة الامان الغذائي.

اتجاه التكنولوجيا: الهندسة الحيوية للمبيدات الطبيعية Bioengineering

باسيلليس ثورينجنسيز (Bt) بكتريا تربة شائعة قادرة علي انتاج بلورات بروتينية تبيد الحشرات خلال السكون كجزء من دورة الحياه الطبيعية. عندما تستخدم علي المحاصيل الحقلية وفي حدائق المنازل كمحلول رش او مسحوق محبب فان البلورة او بروتين – Bt يتم تناولها خلال تغذية الحشرة. معدة الحشرة تنشط البروتين الي صورة سامة. لقد استخدمت صفة القتل هذه في نظم حماية الخضراوات والمحاصيل الاخري خلال ما يزيد عن ٤٠ عاما. هناك صورة عديدة في بروتينات – Bt هذه وكل منها له صفات وخصائص معروفة او مدي ضيق من الفاعلية والكفاءة في ابادة الحشرات. مع التكنولوجيا الحيوية الحديثة فان الجينات اللازمة لخلق بروتين – Bt تم عزلها بسهولة وادخالها في نباتات واصبحت مكون وراثي ثابت في الصنف النباتي الجديد. لقد تم توصيف ما يزيد عن ٥٠ بروتين – Bt متميز واتضح انها تتميز بتاثيرات تثبيطية علي فراشات اللافات والخنافس والذباب والبعوض وغيرها من الحشرات الرئيسية. لقد اتضح ان تغيير حمض اميني مفرد في بروتين – Bt احدث تاثيرات ضخمة درامية في مدي وتخصصية الفاعلية ضد انواع الافات الحشرية.

التخصصية تساهم في احتمالات التطور السريع للمقاومة. الان ولو ان نوعين فقط من الحشرات اصبحتا غير حساسة لبروتين – Bt خاص في الحقل فان اكثر من عشرة انواع كونت مقاومة في الدراسات المعملية. لقد حدث ما يوجب الحذر بشكل اكبر الا وهو اكتشاف ان واحدة من اهم الافات وهي دودة براعم الدخان غير الحساسة لبروتين – Bt واحد كونت مستويات عالية من التحمل للعديد من التوكسينات البللورية للبكتريا – Bt. المقاومة المشتركة هذه تعتبر من الامور الحرجة التي تثير الجدل حول التوسع في زراعة النباتات التي تنتج بروتينات الباسيلليس – Bt. استخدام معلومات تفصيلية عن ترتيبات الحمض الاميني الضروري الخاص يتسابق مطوري هذا الاتجاه لتصميم الحصول علي

بروتيـنات اكـثر فاعلـية واكـثر تخصصية او ما تسمي "بروتينات – Bt معتدلة) تدمج عناصـر المحـددات الوراثـية الطبيعية والمتخصصة لتدبير ومواكبة مدي فاعلية وكيفية احـداث الفعل لبروتينات – Bt. هندسة البروتينات هذه يمكن التنبؤ بها لتقديم انشطة جديدة ضـد الافات الحشرية التي لا يعرف عنها حساسية طبيعية لبروتينات – Bt. هذا للاقتراب يسـتوجب وضـع حلـول مـتوافقة بيئيا والتنبؤ باي خلل يحدث في النظام البيئي. تغير التخصـص تجاه الافات الحشرية وتحوير مكان احداث الفعل للابادة في الحشرة ثم اخذها فـي الاعتـبار من قبل العديد من البحاث مما يقدم استراتيجية ديناميكية ضرورية لادارة المقاومة في الافة.

مـن الاسـتراتيجيات الاخري المقترحة استخدام "التوكسينات المساعدة helper toxins" والتـي تنـتج كذلـك بواسطة بعض تحت انواع باسيلليس ثورينجنسيز. اظهرت الدراسـات الحديـثة بواسطة رجال الحشرات في جامعة UC Riverside ان الجرعات تحـت القاتلـة لتوكسـين بروتيـن ثانـي Cyt A تغلبت علي المستويات العالية من عدم الحساسـية لبروتيـن – Bt في يرقات البعوض. Cyt A له موقع خلوي مستهدف مختلف عـن البروتين – Bt. من المحتمل ايجاد توكسينات مرافقة Co-toxins طبيعي او مخلق لخنفساء كلورادو البطاطس وغيرها من افات الخضر.

<u>لمـزيد من التفاصيل عن ادارة مقاومة الافات ومنتجات Bt والتكنولوجيا الحيوية نرجع اليه:</u>

For More Information On Pest-Resistance Management, Bt-products, or Agricultural Biotechnology:
Pesticide Resistance Management Workgroup
Office of Pesticide Programs
U.S. Environmental Protection Agency
401 M St. S. W., Washington D.C. 20460
contact: Sharlene R. Matten or Paul I. Lewis
(703) 305-7974
matten: sharlene@epamail.ega.gov
lewis: paul@epamail.epa.gov
Information Systems for Biotechnology
120 Engel Hall
Virginia Polytechnic Institute and State Univ. Blacksburg, VA 24061-0308 (540) 231-3747; NBIAP@VT.EDU

By Trevor V. Suslow 2/14/98
Photo Credit: Adult Clorado Potato Beetle – Clemson University Dept. of Entomology, Cooperative Extension

الاخــتلافات بين سلالات باسيلليس ثورينجنسيز التقليدية والنباتات المهندسة وراثيا ضد الحشرات: الاسباب الممكنة للتطور السريع للمقاومة وحساسية الكائنات غير المستهدفة

من مقالة للباحث Beatrix Tappeser في معهد الايكولوجي التطبيقي – فريبرج – المانــيا اعدت للالقاء في ورشة العمل عن الامان الحيوي التي عقدت في الفترة من ١٣- ١٧ اكــتوبر ١٩٩٧ في مونتريال – كندا. لقد اكتشفت Bt بواسطة Ernst Berliner عام ١٩١١ عــندما وجد ان شحنة الدقيق المرسلة من thuringia معدية بممرض معدي. بعد تعــريف بعض صفات هذا الباسيلليس بما فيها التخصص العوائلي لم يمر وقت طويل حتي اجريــت التجارب الاولي للوقوف علي فعاليتها في مكافحة ثاقبة الذرة (١٩٢٨-١٩٣١). ولــم يمــر وقت فيما قبل الحرب العالمية الثانية حتي ظهرت المشاكل الاولي مع المبيدات المخلقــة ممــا ادي الــي بذل محاولات كبيرة لتثبيت الباسيلليس ثورينجنسيز كمبيد حيوي (krieg ١٩٨٦). فــي عام ١٩٩٥ وصل حجم السوق لمستحضرات Bt الي ما يقرب من ٩٠ ملــيون دولار امريكــي وتــم تســجيل ٦٧ مستحضر علي مستوي العالم (kumar واخرون ١٩٩٧). لقد قدر ان مستحضرات Bt تمثل ٨٠-٩٠% من كل المبيدات الحيوية. علــي العكــس فان نصيب هذه المستحضرات لم تتعدي ١-٢% من السوق العالمية الكلية للمبــيدات وهــناك زيادة مستمرة منذ بداية التسعينات. اظهرت الاستطلاعات التي اجريت عام ١٩٩١ تنبؤ الكثير بانه بحلول عام ٢٠٠٠ فان مستحضرات Bt سوف تصل الي ٥-١٠% مــن ســوق المبــيدات العالمي (UTZ Bernhard عام ١٩٩٣). الافات الرئيسية المســتهدفة مع المبيدات الحشرية البكتيرية Bt تشمل العديد من حشرات حرشفية الاجنحة (ابي دقيقات) وثنائي الاجنحة (الذباب والبعوض) وبعض افراد غمدية الاجنحة (الخنافس). لقــد وجــد ان بعــض السلالات تقتل النيماتودا (ادوارد واخرون ١٩٨٨ ، كريج وفوانز ١٩٨٩). مستحضــرات Bt التقلــيدية مثل تلك التي سجلت في المانيا وكذلك علي مستوي العالم اشتقت من السلالة عالية الفاعلية باسيلليس ثورينجنسيز كورستاكي HD-1 والتي تم عزلها في الستينات (Dulmage ١٩٧٠).

خصائص سلالات Bt الموجودة في المستحضرات البكتيرية الباسيللية التقليدية:

معظــم مستحضرات Bt متوفرة في الاسواق وجميعها تخضع لتصاريح وتراخيص فــردية تحــتوي علــي الجراثيم مع الاجسام الضمنية الباراسبورية التي تتكون من الدلتا-اندوتوكســينات. حتي الان تم عزل ٥٠ من جينات دلتا-اندوتوكسين المختلفة تقع في ١٦

تحـــت مجاميع (crickmore واخرون ١٩٩٦). هذه الجينات يمكن ان تحدث في سلالات مختلفة وفي خلائط عريضة متنوعة. في الغالب فان سلالات Bt تكون قادرة لتكوين اكثر مـــن نـــوع واحد من الاجسام البللورية الضمنية وهذه قد تكون انواع مختلفة من جزيئات الدلـــتا–اندوتوكسين. لقد تم تقسيم سلالات Bt تبعا لبروتينات الغشاء وجينات الاندوتوكسين او التوكسين التي تحتويها. بعد ذلك تم تقسيم Bt دلتا–اندوتوكسين عن طريق تتابع تجانس جيـــناتها والتخصص علي الحشرات. كل سلالة Bt فيها عدد مختلف من البلازميد مسئولة عـــن تخليق الاندوتوكسينات المختلفة. السلالة HD-1 تاوي علي الاقل خمسة بلازميدات مخـــتلفة. البلازميدات يمكن ان تحمل العديد من جينات التوكسين وهي في العادة متماثلة. بالاضافة الي ذلك فان باسيلليس ثورينجنسيز وجدت تحمل transposons التي تساهم في حـــدوث النباتات الوراثية الكبيرة في جينات التوكسين الخاصة بها ومن ثم في التوكسينات نفســـها. هـــذا يفسر التنوع الكبير في سلالات Bt. لقد وجد ان سلالات Bt تستطيع تبادل بلازمـــيداتها من خلال عمليات مشابهة للارتباط كما يحدث في معدة يرقات الحشرات. في هـــذا السبيل فان سلالات Bt يمكن ان تتبادل البلازميدات التي تحتوي علي جينات الدلتا– اندوتوكســـينات ومـــن ثـــم تعبر عن نظم فاعلية مختلفة في الانواع المختلفة من حشرات حرشـــفية الاجـــنحة. الجراثـــيم وجزيئات التوكسينات البللورية تفقد نشاطها بسرعة عندما تتعرض للاشعة فوق البنفسجية UV-light.

تركيـــب جيـــنات التوكسين والبروتينات: بعض التراكيب الشائعة لجينات Bt توكسين ادت الي الاقتراح بوجود تباين داخلي built-in مما يعطي البكتريا Bt مرونة كبيرة في احداث الفعـــل في حشرات مستهدفة مختلفة. كما هو الحال مع الاجسام المضادة التي تحتوي علي صـــفات محفوظـــة ومتبايـــنة فان جينات التوكسين والبروتينات تصنع من مناطق تبادلية محفوظـــة ومتباينة. الجزء الطرفي N لبروتين التوكسين مسئول عن السمية والتخصصية ويحـــتوي خمسة مناطق محفوظة. الجزء الطرفي C عادة محفوظ بشكل كبير ويحتمل ان يكون مسئولا عن تكوين البللورة.

دورة العـــدوي Infection cycle: الخطـــوة الاولـــي في دورة العدوي بعد تناول الجسم الـــبللوري الضـــمين للباسيلليس Bt تتمثل في اذابة البروتينات البللورية في الوسط القلوي لمعـــدة الحشرة الي بروتينات ذات احجام ١٣٠–١٤٠ كيلودالتون Kda. تعتمد كفاءة اذابة

بلـورة البروتين علي الوسط السائد في معدة وتركيب الاجسام الضمنية الباراسبورية. في الخطـوة الثانـية فـان البروتيـن المذاب يتعرض للانقسام البروتيني بالتحلل وهذا يعطي التوكسين الفعلي وهو شريحة البروتين بحجم ٦٠-٦٥ كيلودالتون. عملية التحلل البروتيني قـد تتكون وتشمل من ٥ وحتي ٧ خطواط (Choma واخرون ١٩٩٠). الشريحة السامة النهائـية لمعظـم البروتيـنات المشـتركة هي (٢) cry IA والتي يعتقد انها تحتوي علي احماض امينية ٢٩-٦٠٨ كما تم حصرها من النهايات الطرفية N (هوفت ووينلي١٩٨٩). هـذا البروتين المنشط ينتشر خلال الغشاء الغذائي Peritrophic غير المنفذ للبروتوكسين المذاب غير المخمر ذات الحجوم ١٣٠-١٤٠ كيلودالتون ومن ثم يعمل كنوع من الغربال الجزيئـي. حينـئذ يرتبط التوكسين بمستقبلات متخصصة تقع في معدة الحشرة. بناء علي المعلومات حاليا فان هذا يؤدي الي تكوين ثقوب وما يتتبعها من تحطم التدرجات الايونية. هـذه الـثقوب تسـمح كذلـك لخلايـا Bt الخضرية بالانبات من الجراثيم كي تهاجر في الهيمولـيمف وتطـور عملـية السمية من خلال احداث السمية البكتيرية bacteraemia (Marrone and Macintosh ١٩٩٣). لزمن طويل ساد الاعتقاد بان الفعل الابادي علي الحشـرات لبكتريا باسيلليس ثورينجنسيز تقع اساسا في الجراثيم والاجسام الضمنية. حتي ١٩٩٥ لم يكن قد اكتشف kurstakolin وهو عامل اضافي يحفز النمو مما يزيد من سمية مستحضـرات بكتريا Bt بنسبة ٣٠% في الراشح من مزارع الباسيلليس (Asano and Hori ١٩٩٥). لقـد ادي ذلـك الي الاقتراح بان الفعل الابادي لبكتريا Bt علي الحشرات يتكون من تداخلات عالية التعقيد بين البكتريا والعائل الحشري الخاص به.

العلاقات الداخلية بين العائل-الممرض/تطور المقاومة:

اذا اخذنـا جانب الممرض نجد تنوع كبير لجينات التوكسين والتي يمكن ان تحدث في خلائط مختلفة داخل السلالة وتكون قادرة علي التبادل بين السلالات في خلال عمليات مشـابهة للارتـباط. اخـذ مـيزة التباين والمناطق المحفوظة وتتابعات الانتقال او النقل العرضـي تصـبح جيـنات التوكسين مجبرة للنقل المتعدد والدمج مما ادي الي اقتراح ان التبايـن الكبـير في بكتريا Bt يرجع ايضا الي التركيب الفردي لاي جين توكسين. الفعل الابـادي لبكـتريا Bt علـي الحشـرات يحفز بواسطة تحفيز التسمم البكتيري بعد ارتباط بروتينات التوكسين مما يؤدي الي تكوين ثقوب في جدار الامعاء وكذلك من خلال عوامل الـنمو التي اكتشفت حديثا. هناك مطلبان سابقان ومحددان للعدوي في جانب العائل وهما: بيـئة المعـدة يجـب ان يسمح بالذوبان الكافي للجسم او الاجسام الضمنية البللورية ، ان

العوائــل التــي بها البروتيزيس الخاص بها تكسر السموم الاولية المذابة protoxins بما يحقــق انتاج توكسينات فعالة في حجوم مناسبة. هذا ضروري اذا كان علي البروتينات ان تنتشــر خــلال غشاء الغذاء حتي تصل الي المستقبلات الخاصة بها في جدار المعدة. لقد تجمعت ادلة تنادي بان الحشرات قد طورت فعلا وسائل دفاعية خاصة وغير خاصة تعمل عــند مســتويات مختلفة لحمايتها ضد الفعل الابادي علي الحشرات من بكتريا Bt بمجرد تــناول الاجسام الضمنية البللورية. تخصصية المستقبل تفترض دور محدد واضح في هذه الوسيلة الدفاعية. قبول العائل لاذابة البللورات واستكمال الدور بواسطة الانزيمات المحللة للبروتيــنات "بروتيــيزيس" لا تمر بدون تاثيرات ولكن دورها في ظهور وتطور المقاومة ذات اهمية كبري علي ما يبدو. هذه العوامل ذات تاثير قوي علي فعالية الاندوتوكسين في العوائــل الحساســة وربما يكون في العوائل غير المستهدفة. غياب ضرورة اذابة جزيئات الاندوتوكســين وكســرها أي البروتيــن الي حجوم اصغر في الحشرات التي تتغذي علي النــباتات المحــورة وراثيا قد يكون لها تاثير علي حساسية الكائنات غير المستهدفة. لسوء الحــظ لا توجد بحوث لتقييم الاختلافات بين مستحضرات Bt الثابتة بدون تغيير وشركائها من ذوات التحوير بالهندسة الوراثية.

فــي الوقــت الراهن يوجد القليل من التقارير التي تشير الي بعض انواع الحشرات التــي كانــت حساســة فــي البداية ثم كونت مقاومة بعد الاستخدام المكثف لمستحضرات الباســيلليس Bt فــي الحقــل. بعض الدراسات استخدمت التوكسينات المنقاه مما اتاح لهم محاكــاه موقــف النباتات المهندسة وراثيا لحد بعيد ولكن ليست محاكاه لمستحضرات Bt التقلــيدية. لقــد كونــت حشرة واحدة أي نوع واحد فقط وهو الفراشة ذات الظهر الماسي مقاومــة لبكــتريا Bt فــي مجاميع الحشرات في الحقول المفتوحة مع ان المقاومة تكرر حدوثهــا فــي المعامل. لقد اظهرت دراسة حديثة امكانية حدوث مقاومة سريعة. لقد وجد Gould واخــرون ١٩٩٧ تكــرارية الليلات المقاومة تساوي ١,٥×١٠^٣ في دورة اللوز الامريكــية وهي افة خطيرة في زراعات القطن. هذا التقدير يتعدي المستوي الاعلي لاية تقديــرات مســتخدمة لحساب المدي الزمني لتطور المقاومة. دودة اللوز الامريكية حساسة جــدا لمستحضــرات Bt. لذلك خلص البحاث الي انه يلزم ١٠ سنوات كي تمثل المقاومة مشــكلة خطيرة في مجاميع الحشرات هذه. هذه التقديرات تاخذ في الحسبان ان ٤% مأوي اتبعت كاستراتيجية كما اقترح بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية.

الانــواع الاخــري من الحشرات مثل دودة لوز القطن وثاقبة الذرة الاوربية وجدت اقــل حساســية. لقــد قام مقدمي هذه المقالة بحساب مجاميع تعداد هذه الافات وقالوا انها

ستصبح مقاومة خلال ٣-٤ سنوات حتي مع مساحة مأوي ٤% حيث ستعطي نفس تكرارية السلالات المقاومة. هذه الفترة تعتبر قصيرة للاستغلال الفعال لمعظم وسائل المكافحة الحيوية حيث لا وقت وهو غير كافي كذلك لاسترجاع الاستثمارات التي انفقت في الحصول علي وتطوير النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt. كلونة اثنين او اكثر من توكسينات Bt يفترض ان تطيل من الفترة اللازمة لتطور المقاومة لانة يفترض ان الفطريات غير المرتبطة او المستقلة مطلوبة لمضادات كل توكسين. لقد اوضح Tabashrik ومعاونوه (١٩٩٧) ان المقاومة المشتركة لاربعة توكسينات مختلفة قد ترجع الي واحد من الجينات الذاتية الجسيمة المنتخبة والتي تحدث مقاومة متناهية في الكبر لهذه التوكسينات في سلالة واحدة من الفراشة ذات الظهر الماسي. يعتقد بعض البحاث ان الحدوث القليل للمقاومة في الحقل لابد وان يحدث في وجود جينات توكسين متعددة في السلالات الفردية لبكتريا Bt. لقد اظهرت دراسات قام بها Dai and Gill ان البعوض الذي عومل بالباسيلليس اسرائيلينسيز لاكثر من ٢٠ جيل ثم تعرض لمستحضر اندوتوكسين الجرثومي او لمستحضر التوكسين المنقي انة قد حدثت درجة متوسطة من المقاومة في الحالة الاولي (ثلاثة امثال) مقارنة بسبعين مثل في الثانية. حقيقة ان تطور المقاومة في الحقل المفتوح مع مستحضرات Bt التقليدية نادرة الحدوث جدا مما يحجب الرؤية عن معنوية الفروق بين النباتات المهندسة وراثيا المقاومة للحشرات والمستحضرات البكتيرية التجارية.

النباتات المحورة وراثيا المقاومة للحشرات Insect resistant transgenic plants

كقاعدة عامة فان النباتات المقاومة للحشرات المحورة وراثيا يتم هندستها عن طريق جينات التوكسين الفردي المعزول. حقيقة ان الكود او الشفرة الوراثية للنباتات تختلف قليلا عن تلك الخاصة بالبكتريا مما يجعل من الضروري استخدام جينات مخلقة والتي تم فيها تغيير تتابع النيوكلوتيد بطريقة تجعلة محافظا ومستمرا في تشفير تتابع الحمض الاميني البكتيري المطلوب. من غير الممكن استخدام جينات توكسين كاملة في النباتات لانها غير ذاتية بشكل كافي في الخلايا النباتية (التوكسينات الاولية هي فقط التي تذوب مع درجة حموضة اعلي من ٩,٥، بينما الحموضة في الخلايا النباتية حوالي ٧,٦). لقد امكن التغلب علي هذه المشكلة باستخدام جينات متفرعة قادرة علي انتاج جزيئات كاملة للتوكسين المنشط وتستقر في الخلية النباتية في صورة مذابة. الذرة المقاومة للحشرات والذي تم هندسته وراثيا بواسطة شركة سيبا (الان نوفارتس) تحتوي علي نسختان من الجين

المـــتفرع المخلـــق cry IA (b). هـــذا الجين يحتوي علي ٦٤٨ حمض اميني الاولي في التوكســـين الاولي والذي يتكون في العادة من ١١٥٥ حمض اميني. بسبب تحويرة وتكيفة مـــع الشـــفرة الجينـــية او الوراثية التي تستخدم بواسطة النباتات فان التتابع النيوكلو تيدي للجيـــن المخلـــق ٦٥% فقط تجانسا مع الجين الاصلي. الجين المخلق يلحم في البداية مع الـــبادئ فوســـفوانيول بيروفات كربوكسيليز للذرة وهو المسئول عن خلق البروتين في كل الانســـجة الخضراء للذرة، ثانيا للبادئ الخاص في حبوب اللقاح للذرة والتي تمكن من خلق البروتين في حبوب اللقاح. البروتين الباقي ذي ٦٤٨ حمض اميني يحتمل ان يمر بعد ذلك بخطوتان او ثلاثة نحو التحلل والكسر في البيئة القلوية قبل ان يصبح بروتين باقي ٥٦٤ – ٥٧٨ والـــذي اعلنت شركة نوفارتس انه توكسين كامل الفاعلية. تبعا لمصادر اخري فان التوكســـين النشـــط الفعال في اكثر صورة المتفرعة يملك احماض امينية ٢٩-٦٠٧. هذا يعطي دليل ان البروتين الفعال يملك ٥٧٨ حمض اميني والثمانية والعشرين الباقية تزال او تزيل N-الطرفية وC-الطرفي.

لقد استتبع ذلك التاكد بان النبات المقاوم للحشرة يحتوي علي نسخة متفرعة من جين الدلـــتا-اندوتوكســـين والتـــي تخلق بروتين بادئ قصير والذي يخلق من خلال دورة النمو الخضـــري ويســـتقر فـــي النبات في صورة مذابة. نظرا لحجم الصغير يصبح محتملا ان جـــزئ التوكســـين المذاب يمكن ان ينتشر مباشرة خلال الغشاء الغذائي بدون اية خطوات انقســـام لاحق. لا توجد خلفية وراثية عن جينات التوكسين المختلفة كما لا توجد محفزات للسمية في الوقت الحالي ولا توجد احتمالات لحدوث التسمم البكتيري لتعضيد الفعل القاتل للمرض.

<u>بعـــض الاستنتاجات الهامة</u>: الوسائل التي تؤدي الي حدوث تغيرات هامة في التداخل بين العائل والممرض والتغيرات التي تؤدي الي تحفيز تطور المقاومة ربما تكون ذات درجات مـــن الكـــبر والقـــيم المتباينة. بالاضافة الي ذلك فان هناك بعض الارشادات والاقاويل ان النـــباتات المهندســـة وراثـــيا لا تنـــتقل وسائلها السامة الي الحشرات الاخري غير الافات بطريق غير متوقع. تغذية الحشرات النافعة علي يرقات سامة من ثاقبة الذرة الاوربية ادت الـــي قـــتل اثنين او ثلاثة من هذه الحشرات النافعة. حتي تغذيتها علي يرقات غير حساسة لانـــواع اخري ادت الي قتل هذه المفترسات التي تغذت علي هذه اليرقات. لقد اجريت هذه الـــتجارب بواسطة بحاث سويسريون في المحطة القومية للبحوث الزراعية والا يكولوجيا

الزراعـــية. التاثــيرات علي الكائنات النافعة غير المستهدفة ظهرت مع حشرة الكولومبولا وقــد اتضـــح ان التاثيرات غير قليلة. يبدو اننا في حاجة للاسراع بمناقشة وضع وجدوي وســبل الحفاظ علي النباتات المقاومة للحشرات كاحد اهم الوسائل الحيوية البديلة للمبيدات التقلـــيدية. هـــذا يســـتدعي عمـــل ميـــثاق شـــرف لمـــنع الـــتلوث الوراثـــي GENETIC.POLLUTION غـــير التهجين. التوكسين المحور او المتغير قد تكون له المقدرة علي قتل الاخرين ناهيك عن الكائنات غيرالمستهدفة. هناك ادلة متوفرة في الوقت الراهـــن تشـــير الي النباتات المقاومة عن طريق الهندسة الوراثية لها تاثيرات سالبة علي الـــزراعة المتواصلة والبيئة. لذلك يجب اجراء تقويم للمخاطر المبنية علي الاسس العلمية واخذها في الحسبان وعدم تجاهله.

Literatur

Asano S and llori II (1995) Appl. Entomol- Zool. 30 (2), 369-374, xiticrt nach Kumar PA, Sharma RP, Malik VS (1997) The Insècticidal Proteins of Bacillus ihuringiensis. Advances in Applied Microbiology 42, 1-43

Bcrnhard K and Utz R (1993) Production of Bacillus thuringiensis Insecticides for Experimental and Commercial Uses. in; Entwisllc PK, Gory JS, Bailey, MJ, lliggs S (Eds.) (1993) Bacillus ihurlngi.ensis, An Environmental Biopcsticidc; Theory and Practice. John Wilcy &. Sons, Chichester UK-

Crickmorc N, Zciglcr DR., Fcitclson J, Schncpf E. Lambert B, Lcreclus D, Baum J, Dean DIl (1996) Genes Microbiol. Rev., y.iticrt nach Kumar PA, Sliarma RP, Malik VS (1997) The Insecticidal Proteins ofBacillus thuringiensis. Advances in Applied Microbiology 42, 1-43

Edwards DL, Payne J, Scares GG (1988) Novel isolates of Bacillus thuringiensis having activity against ncmatodes. European Patent Application, EP 0 303 426 A2

Environmental Protection Agency (1995) Pesticide fact sheet; 'Bacillus thuringiensis' CrylA(b) delta-endotoxin and the genetic

material necessary for its production (plasmid vector pdB443 1) in corn. Washington, DC

Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, llcckcl DG, Lope/- J, Micinski S, Leonard R, Laster M (1997) Initial frequency ofallcles for resistance to Bacillus thuringiensis toxins in Held populations of Hcliothis vircsccns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Stales of America 94, 3519-3523

Hoftc II, Whitclcy 11R (1989) Insecticidal Crystal Proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiological Reviews 53, 242-255

K-ricg A und Franx JM (1989) Lchrbuch dcr biologischcn Schadlingsbekampfung. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Kricg A, Hugcr AM (1986) Symposium in mcmoriam Dr. Ernst Bcrlincr, Dan-nstadt 25.8.1986. Mitlcilungcn aus dcr Biologischcn Bundcsanstalt (Tir Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlcm,
Hca 233

Kumar PA, Sharma RP, Malik VS (1997) The Insccticidal Proteins of Bacillus ihuringiensis. Advances in Applied Microbiology 42, 1-43

Lercdus D, Dclccluse A, Lecadct MM (1993) Diversity of Bacillus ihunn^iensis^i'oxms and Genes. In: Entwistle et al. (1993), a.a.O., S. 255 - 267

Marronc PG and Macintosh SC (1993) Resistance to Bacillus tl^irin^icnsis and Resistance Management. In: Lntwistle ct al (1993), a.a.O., S. 221 - 235

Pcrlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPhcrson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Nail. Acad. Sci. USA 88, 3324-3328

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to Bacillus thuringicnsis. Annual Review of Entomology 39, 47 -79

Tabashnik BE, Liu Y-B, Finson N, Masson L, llcckcl DG (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four Bacillus thurin^iensis toxins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94, 1640 -1644

Visscr B, Bosch D, llonec, G (1993) Domain-Function Studies of Bacillus th urin ^ii'nst.^ Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle ct al. (1993), a.a.O., S. 71 - 88

بعض الجوانب الخاطئة عن السمية والسلوك البيئي للباسيلليس ثورينجنسيز:

الباسـيلليس ثورينجنسيز (B) كائن دقيق حي يقتل بعض الحشرات كما يستخدم في القضـاء علي الحشرات الضارة غير المرغوبة في الغابات والزراعة والمناطق الحضرية. فـي الصـورة المـنقاه فان بعض البروتينات التي تنتج بواسطة Bt ذات سمية حادة علي الثدييـات. هذا بينما في الصورة الطبيعية تكون السمية الحادة للاصناف الشائعة المستخدمة فـي Bt محـدودة علي يرقات الحرشفية الاجنحة ويرقات البعوض والخنافس. Bt ترتبط قريـبا من B.cereus وهي البكتريا التي تسبب تسمم غذائي و B.anthracis وهي وسيلة مـرض الجمرة الخبيثة anthrax. لقد اجريت قليل من الدراسات علي التاثيرات الصحية المزمـنة والسـرطانية والطفرية لبكتريا الباسيلليس Bt. الافراد الذين يتعرض لبكتريا Bt تـتكون مـن حساسـية في التنفس والعيون والجلد كما حدثت حالة قرحة في القرنية بعد الـتلامس المباشـر لمستحضـر Bt. كذلك يعاني الناس من الحساسية من المواد الخاملة (السرية في تجهيز المستحضرات). لقد وجد ان الناس الذين لديهم اجهزة مناعية سليمة قد يكونـون ذوي حساسية خاصة لبكتريا Bt. جراثيم Bt الحية تبقي لمدة سنة علي الاقل بعد المعاملـة. لقد تم توثيق مقاومة الحشرة لبكتريا Bt. الهندسة الوراثية قد تؤدي الي توسيع دائـرة اسـتخدام Bt واسرع حدوث مقاومة اكثر. التطبيقات الواسعة لبكتريا Bt قد تحدث تاثـيرات ايكولوجية Bt. تستطيع احداث خفض كبير في عدد وانواع الحشرات والفراشات ممـا قـد يـنعكس علـي احداث تاثيرات ضارة علي الطيور والثدييات التي تتغذي علي الحشـرات التي عوملت بالبكتريا. بالاضافة الي ذلك فان عدد من الحشرات الناطقة تتاثر عكسيا بواسطة Bt.

بكـتريا Bt اقل سمية علي الثدييات كما اظهرت تاثيرات قليلة علي البيئة بالمقارنة بالعديد من المبيدات الحشرية المخلقة. لذلك لا يوجد سبب لاستخدامها باسلوب مختلف عن المـألوف مـع المبيدات الاخري. لذلك فان تاثيراتها البيئية والصحية وكذلك ما يتعلق بكل الـبدائل الاخري يجب ان تؤخذ في الاعتبار قبل ان يسمح باستخدامها Bt يجب ان تستخدم فقط عند الضرورة وبكميات اصغر بقدر الامكان. كذلك تستخدم كجزء من برنامج الادارة المتواصـلة. حيـث انـه قد سجلت اضرار المبيدات التقليدية واسعة الانتشار فان البحاث يـنظرون فقط للمبيدات التي تحدث سمية فقط علي الافة المستهدفة والتي تكون اقل تاثيرا علي الانواع الاخري كما لها قليل من الاضرار البيئية. الباسيلليس ثورينجنسيز (Bt) مبيد حشـري مـن نـتاج هـذه البحوث. هناك دليل يقترح ان Bt ليست هي الوسيلة المعتدلة

benign كما يريد الصناع ان يقنعونا مما يستدعي اتخاذ الحذر مع استخدامها. الباسيلليس Bt نوع من البكتريا التي لها فعل ابادي ضد الحشرات تؤثر علي مدي اختياري من رتب الحشــرات. يوجـد ما يقرب من ٣٤ تحت نوع من Bt (وهي تسمي طرز سيرولوجية او اصناف) وتحميل وجود اكثر من ٨٠٠ عزلة سلالية. لقد تم عزل Bt لاول مرة كما سبق القــول فــي عام ١٩٠١ في اليابان من يرقات دودة الحرير المريضة. بعد ذلك عزلت من فــراش دقــيق البحر المتوسط واطلق عليها الباسيلليس ثورينجنسيز في عام ١٩١١. حتي عــام ١٩٥٨ لم تستخدم Bt عل نطاق تجاري في الولايات المتحدة الامريكية. بحلول عام ١٩٨٩ اصبحت منتجات Bt تمثل ٩٠-٩٥% من سوق المبيدات الحيوية.

الباسيلليس ثورينجنسيز في صورة المنتجات المتاحة في اسواق امريكا تشمل خمسة اصــنــاف Bt وهــي كورستاكي، موريسوني والتي تحدث مرضية في الفراشات والديدان، اسرائيلينسيز التي تسبب المرضية في يرقات البعوض والذباب الاسود، ايزاوايا التي تسبب المرضــية فــي يــرقات فراشة الشمع، تينيبريونيس والتي يطلق عليها ايضا الصنف سان ديــيجو والتي تسبب مرضية في يرقات الخنافس. لقد اكتشفت سلالات اخري من Bt ذات فعــل ابــادي علــي الحشرات والنيماتودا والاكاروسات والديدان المفلطحة والبروتوزوا، تستخدم منتجات Bt في مكافحة الافات الحشرية في بساتين الفاكهة والخضراوات ومناحل العسل والذباب الاسود والبعوض في البحيرات والمستنقعات وغيرها من افات الخنافس في الخضــراوات واشــجار الظل. الاسماء التجارية الشائعة تشمل ديبيل ، فوراي ، ثورسيد (كورستاكي) وفيكتوباك، موسكيتو اتاك (اسرائيلينسيز) وإم تراك (Bt تينيبريونيس).

<u>كيفية احداث الفعل Mode of action</u>: عندما لا تكون ظروف النمو غير مناسبة لبكتريا Bt فانها كغيرها من البكتريا تكون جراثيم. الجراثيم مرحلة سكون في دورة حياه البكتريا حيــث ينتظر الكائن من خلالها حتي تتحسن ظروف النمو الافضل. علي عكس العديد من البكــتريا الاخــري فانه عندما تنتج بكتريا Bt الجراثيم فانها تخلق ايضا بللورات البروتين هــذه الــبللورات تمثل المكون السام للباسيلليس Bt. بعد ان تقوم الحشرة بتناول Bt تذوب الــبللورات فــي معــدة الحشرة القلوية. بعدئذ تقوم الانزيمات الهاضمة في الحشرة تبكير تركيــب الــبللورة وتنشيط المكون الابادي ضد الحشرات للباسيلليس Bt والذي يطلق عليه دلــتا-اندوتوكسين. يقوم الدلتا-اندوتوكسين بالارتباط بالخلايا المبطنة لغشاء المعدة ويحدث ثقوب في الغشاء مما يحدث خلل في التوازن الايوني في المعدة. في الحال تتوقف الحشرة

عن التغذية وتجوع حتي الموت. اذا لم تكن الحشرة حساسة للفعل المباشر للدلتا-اندوتوكسين يحدث الموت بعد بداية البكتريا Bt في النمو الخضري داخل معدة الحشرة. يحدث انبات للجراثيم بعد كسر غشاء المعدة ثم تتكاثر وتنتج جراثيم اكثر. هذه العدوي العريضة للجسم تحدث قتل للحشرة.

العوامل التي تؤثر علي الاختيارية Factors affecting selectivity

من اكثر الخصائص المطلوبة في بكتريا الباسيلليس Bt الاختيارية، حيث ان بعض انواع الحشرات هي الحساسة فقط للدلتا-اندوتوكسين. لقد قام العلماء بتعريف ٢٩ نوع علي الاقل من البللورات والدلتا-اندوتوكسينات، كل منها فعال ضد حشرات معنية. كل صنف من Bt يستطيع انتاج واحد او اكثر من هذه التوكسينات. المحاليل القلوية (قاعدية - درجة حموضة اكثر من ٧) تنشط الدلتا-اندوتوكسين والاصناف المختلفة من البكتريا تتطلب درجات حموضة مختلفة. بعض الانزيمات يجب ان توجد في معدة الحشرة لكسر البللورة الي عناصرها السامة. بالاضافة الي ذلك فان بعض صفات الخلية في معدة الحشرة تشجع ارتباط الاندوتوكسين وما يستتبع ذلك من تكوين الثقوب. عمر الحشرة يعتبر من العوامل المؤثرة كذلك فقد وجد ان اليرقات الصغيرة اكثر حساسية من اليرقات كبيرة العمر.

اختبارات التأثيرات الصحية: حيث ان Bt كائن ميكروبي حي فان اختبار الاضرار الممكنة للباسيلليس تجري بشكل مختلف عما يحدث مع المبيدات التقليدية. السمية الميكروبية توصف بالمرضية (قدرة الميكروب علي احداث المرض) والعدوي (قدرة الكائن علي التكاثر في الجسم). وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لا تطلب اختبارات عن السرطانية والطفرية والسمية الجديدة لبكتريا الباسيلليس Bt.

الاختبارات المعملية عن السمية الحادة: كل واحد من بين اكثر من ٨٠٠ سلالة من Bt قد يحدث سمية مختلفة علي الحشرات والقوارض والانسان. هذه الحقيقة تعقد من أي مناقشة عن سمية Bt. فيما يلي ملخص للسمية الحادة لنوعين شائعين من اصناف Bt.

١- **باسيلليس ثورينجنسيز الصنف كورستاكي (Btk):** بكتريا Btk ومنتجاتها التجارية عادة لها سمية حادة قليلة عن طريق الفم علي الجرذان. في الاختبارات علي حيوانات المعامل لم يلاحظ البحاث ايه تاثيرات معاكسة بعد التغذية علي جرعات كبيرة. بعض

انــواع الــتعرض الاخــري اظهــرت بعــض التاثيرات الحادة. الجرذان التي قامت باستنشــاق الهــواء المحــتوي علي جراثيم Btk عانت من هبوط في التنفس كما ان جراثــيم Btk التــي حقنت في اوردة الجرذان احدثت تفاقم في الامراض التي كانت موجودة مسبقا. كلا Btk والفوراي 4&B تسببا هياجا في جلد الجرذان بينما الفوراي 4&B يحدث هياج في العيون بشكل متوسط.

٢ـ **باسيلليس ثورينجنسيز الصنف اسرائيلينسيز (Bti)**: في دراسات تقييم السمية الحادة لبكــتريا Bti علي الثدييات حدث الموت فقط عندما حقنت Bt في البطن او المخ. في دراســة واحــدة اجريــت علي الجرذان حدثت نسبة موت ٧٩% بعد حقنه واحدة في المخ. قد تحدث تاثيرات اخري بخلاف الموت ومثال ذلك ما حدث من تضخم الطحال عــند حقــن الفــئران بمعلق Bti. مستحضر Bti يحدث هياج وحساسية في الاعين والجلد. ان حقن جراثيم Bti الحية وغير النشطة تحت الجلد ادت الي حدوث وتكوين خــراريج فــي الجــرذان. لقــد حدثت حساسية وهياج في عيون الارانب من جراء الــتعرض Bti بدرجات مختلفة تعتمد علي المواصفات الطبيعية للمستحضر وقد وجد ان مستحضــرات التعفــير ذات احجــام الجســيمات الصغيرة اقل احداث للهياج كما تتضــمن مــن العيون بسرعة اكثر من المستحضرات المتكتله ذات الجسيمات الاكبر حجمــا. في الصورة المنقاه كان الاندوتوكسين الخاص ببكتريا Bti سام بشكل واضح علــي الثديــيات. عندما تم حقن الدلتا-اندوتوكسين من Bti في اوردة الجرذان حدث شلل سريع تم خلال ساعة. عندما تم حقن نفس الجرعة في الجرذان المرضعات حدث المــوت خــلال ٢-٣ ســاعات. يسبب الدلتا-اندوتوكسين كذلك تحطم في خلايا الدم الحمــراء في الجرذان والفئران والاغنام والاحصنه والانسان. عندما تم عزل بروتين صغير من الاندوتوكسين ومعاملته في الجرذان بجرعات غير قاتلة عانت الجرذان من سخونة شديدة وخفض في ضربات القلب.

<u>السمية الحادة علي الانسان Acute toxicity to humans:</u>

١ـ **باســيلليس ثورينجنسيز الصنف كورستاكي**: لقد اجريت دراسات قليلة لتقييم سمية Btk علــي الانســان. لقد تحصل علي معظم المعلومات من التعرض المهني او من الــتعرض الحادث خلال البرامج التوسعية لبكتريا Btk. لقد حدثت حالة عدوي واحدة مــن فــلاح حدث تناثر لمستحضر الديبيل Btk في العيون حيث حدثت له قرحة في

القرنـية وقـد تـم عمـل مزارع Btk منها. رجل اخر كان يعمل في برنامج الرش وتـناثرت البكـتريا Btk علي وجهة وعيونة ثم حدث للرجل هياج في الجلدوحروق وانـتفاخ واحمرار. لقد تم زراعة مزرعة من عينة اخذت من عيون هذا الرجل. لقد وردت تقارير تفيد بان عمال الرش الارضي لمستحضر Foray 48B ظهرت عليهم اعراض من هياج وحساسية في الاعين والانف والحلق والجهاز التنفسي. لقد تاكد ان شدة الحساسية ترتبط بدرجة التعرض. العمال الذين يعانون من مشاكل صحية مسبقة كـانوا اكـثر معانـاه مـن التاثـيرات المعاكسـة مـن جراء الرش الارضي بهذه المستحضـرات البكتـيرية. لقـد نقلت امرأة تعرضت لانجراف مستحضر Btk الي المستشفي بسبب حدوث الالتهابات والهرش والانتفاخ في وجهها واعلي الصدر. بعدذ لـك تطورت الاعراض الي ظهور حمي وفقد الوعي ونوبات الغيبوبة. لم يمكن زرع Bt من عينات نسيجية منها ولكن الاطباء المعالجون لهذه السيدة يعتقدون ان Bt كانت المسبب للاعراض الاكلينيكية (السريرية).

اظهرت دراسات الحصر او الاستكشاف بعد برامج الرش الموسع ببكتريا Bt ان الناس الذيـن تعرضوا يحملون البكتريا Bt في انسجة الجسم. مثال ذلك ان اكثر من ١١% مـن عينات سحبة الانف التي اخذت من المصابين تحت العلاج في فانكوفر بكندا بعد برنامج الرش ضد الفراشة الغجرية وجدت تحتوي علي Btk. لقد وجدت البكتريا Bt كذلـك فـي المزارع التي اخذت من مصابين في مقاطعة لين كاونتي-اوريجون بعد بـرنامج الرش ضد الفراشة الغجرية هناك. اظهرت دراسات الحصر كذلك ان الناس الذيـن تعرضـوا للرش عانوا من مشاكل صحية مختلفة يعتقد انها مرتبطة بالتعرض لبكتريا Bt. مثال ذلك انه خلال برنامج الرش في فانكوفر ظهرت مشاكل صحية علي ٢٥٠ انسـان معظمهـا كـان في صورة حساسية او اعراض تشبة الانفلونزا. خلال بـرنامج مكافحـة الفراشة الغجرية في واشنطن ظهرت مشاكل صحية فيما يزيد عن ٢٥٠ انسـان عولـج ٦ مـنهم في غرف الطوارئ من الحساسية والربو. لم يستطيع الاطباء الربط الدقيق بين التعرض لبكتريا Bt والمشاكل الصحية هذه.

٢ـ باسـيلليس ثورينجنسيز الصنف اسرائيلينسيز: لقد تم تسجيل حالة واحدة فقط عن التاثيرات المعاكسة للبكتريا Bti علي الانسان. لقد تناولت هذه الحالة باحث قام بحقن نفسـة بخليط من Bti ونوع اخر من البكتريا شائع وجودة علي الجلد في الانسان. لقد عاني هذا الباحث من تفاعل سام وحدث هياج في الاوعية الليمفاوية. عندما حقنت هذه

البكتريا بعد ذلك في القوارض كان هذا المخلوط ذات تاثيرات سامة بشكل ثابت ولكن عندما تم حقن كل نوع من البكتريا علي حدة حدث هياج قليل في الجلد slight inflammation.

بعض النواحي الخاصة عن سمية بكتريا Special concerns :Bt

التوكسينات الخارجية **Exotoxins**: الاختبارات الاولي التي اجريت للكشف عن سمية بكتريا Bt اجريت علي الصنف ثورينجنسيز وهي السلالة المعروف انها تحتوي علي توكسين ثاني يسمي البيتا-اكسوتوكسين beta-exotoxin. من المؤكد ان البيتا-اكسوتوكسين سام للفقاريات مع جرعة نصفية قاتلة LD50 تساوي ١٣-١٨ ملليجرام لكل كيلوجرام من وزن الجسم (مللجم/كجم) في الجرذان عندما تحقن في البطن. لقد ادت جرعة فمية ٢٠٠ مللجم/كجم يوميا الي الفئران بعد ثمانية ايام. البيتا-اكسوتوكسين تسبب تلف وراثي في خلايا الدم في الانسان. مستحضرات Bt التي تحتوي علي البيتا-اكسوتوكسين لم تستخدم في معظم الدول ولو انه جرت محاولات لتسجيل هذه المستحضرات في الولايات المتحدة الامريكية. هناك توكسين اخر ينتج بواسطة البكتريا هو الفا-اكسوتوكسين وهو شديد السمية الحادة علي الفئران. طرق الانتاج الحالية لبكتريا Bt تجعل من الالفا-اكسوتوكسين غير ذات اهمية كمكون في مستحضرات Bt.

البكتريا المرتبطة **Related bacteria**: بكتريا Bt تنتمي الي مجموعة صغيرة من انواع البكتريا قريبة الارتباط ببعضها قبل B.cereus وهي بكتريا ترتبط بحدوث التسمم الغذائي B.anthracis وهي بكتريا ممرضة بعنف في الحيوان مسببة مرض الجمرة الخبيثة anthrax. هذه الانواع الثلاثة من البكتريا شديدة الشبة ببعضها لدرجة وضع نظرية تقول بانهم اصناف Varieties لنفس النوع. اذا تم زراعة B.cereus مع خلايا Bt تنتقل المادة الوراثية الي خلايا السيريوس بما يسمح للسيريوس بانتاج بروتينات بلورات بكتريا Bt. انتقال المادة الوراثية بين Bt انثراكيس وبكتريا Bt حدثت كذلك. التوكسين الناتج من بكتريا باسيلليس سيريوس والتي تسبب اسهال في القرود تنتج كذلك بواسطة بعض سلالات Bt ولو ان هذا التوكسين لا يستحب وجودة في مستحضرات جراثيم Bt. لقد عاني المتطوعون من البشر من الغثيان والقئ والاسهال والام القولون وحمي بعد اكل طعام ملوث بواحد من سلالة Bt وكذلك باسيلليس جاليري.

زيـــادة الحساسية Increased susceptibility: الناس الذين يعانون من مشاكل النظم المناعية او الحساسية المسبقة قد يكونوا ذوي حساسية خاصة لتاثيرات الباسيلليس Bt. في الجرذان التي تعاني من نقص وظائف جهاز المناعة كانت الجرعة النصفية القاتلة LD50 عـــن طـــريق الحقن تساوي قيمة اقل بمرات عديدة عن اعلي جرعة عوملت في الجرذان الســـليمة العاديـــة. الجرذان ناقصي المناعة اظهرت نسبة موت اعلي من الجرذان العادية عـــندما حقنـــت بجرعة واحدة من Bti في تجويف البطن. مع هذا لم تسجل حالات مؤكدة دقـــيقة عن Bt سببت عدوي في الناس ناقصي المناعة. لذلك اوصي الاطباء بقسم الصحة العامـــة فـــي ولايـــة اوريجون بضرورة مغادرة العاملين الذين يعانون من نقص المناعة الشـــديدة اماكن المعاملة والرش في الحملة الخاصة بمكافحة الحشرة ببكتريا Bt. لقد اشار صـــناع المستحضر Foray 48B ان كمية الرش التي يتعرض لها الفرد القائم او المشترك فـــي حملـــة المكافحة بمستحضر المبيد البكتيري هذا قليل للغاية حتي يحدث حساسيات او الـــتهابات جديدة. لقد اضاف اصحاب المستحضر انه من الممكن لاي فرد من هؤلاء الذين يعـــانون من الحساسية فعلا لواحد من مكونات Fory 48B ان يضار اي واحد من هؤلاء الذيـــن يعانون من الغيبوبة ان يتاثر من جراء التعرض لكميات صغيرة من الفوراي ٤٨-ب. اشـــارت اســـتمارة بـــيانات امان الفوراي ٤٨-ب الي ان تكرار التعرض عن طريق الاستنشاق يمكن ان يؤدي الي حساسية.

الملوثـــات او مســـببات الاتساخ CONTAMINANTS: في منتصف الثمانينات كانت العديد من منتجات Bt ملوثة ببكتريا اخري مثل streptococcus faecium و Sfaecalis . بالـــرغم مـــن ان مستحضرات ومنتجات Bt تتعرض للاستكشاف الروتيني للكشف عن تلوثـــات بكتـــيرية اخـــري الا ان خطر التلوث او الاتساخ ببكتريا مرضية اخري موجودة دائمـــا. ســـوف اكتب هذه الجملة بالانجليزية حتي يقف مسئولي هذه الوسيلة الحيوية علي بعض جوانب الخطورة من التلوث:

> *"While Bt products are routinely monitored for bacterial contaminant, the risk of contamination with a disease-causing bacteria is always present"*

المــواد الخاملـــة Inert ingredients: كــل منتجات Bt تحتوي مواد اخري بخلاف البكـــتريا Bt لقــد تــم تعريف هذه المكونات بالمواد الخاملة وقد اعتبرت مواد ذات سرية خاصـــة مـــن قبل صناع هذه المنتجات. لقد تاكد ان المواد الخاملة كما يطلقون عليها تمثل اكـــثر المكونات سمية في هذه المستحضرات البكتيرية. مثال ذلك انه خلال برنامج الرش لمكافحـــة الفراشة الغجرية في ولاية اوريجون عام ١٩٩٢ اتضح ان السيدة التي تعرضت للفـــوراي ٤٨-ب كان عندها حساسية مسبقة للمواد الكربوهيدراتية التي كانت موجودة في المادة الخاملة. خلال ٤٥ دقيقة من التعرض عانت من الم مبرح وظهور اعراض عصبية. بســـبب الـــنظرة للمواد الخاملة علي انها من اسرار التجارة الا انه توجد بعض المعلومات العامـــة عن تركيبها وتعريفاتها وهي قليلة. المعلومات المتاحة عن هذه المواد الخاملة انها تسبب مشاكل صحية. الفوراي ٤٨-ب يحتوي علي ايدروكسيد صوديوم وحمض كبريتيك وحمـــض فوسفوريك وميثيل بارابين وفوسفات بوتاسيوم كمواد خاملة. بالرغم من ان هذه المـــواد تمثل اقل من ١٠% من الفوراي ٤٨-ب فانها تسبب ضرر. ايدروكسيد الصوديوم والـــذي هـــو شائع بالاسم "Lye" يسبب تأكل شديد في العيون والجلد والاغشية المخاطية والجهـــاز الهضمي.... وغيرها. استنشاق غبار ايدروكسيد الصوديوم او الرزاز يؤدي في الحـــالات المعـــتدلة الي هياج وحساسية في الاغشية المخاطية للانف وفي الحالات الشديدة يؤدي الي تلف القناه التنفسية. احماض الكبريتيك والفوسفوريك كلاهما يحدث تأكل. حمض الكبريتـــيك يمكـــن ان يحـــدث حـــروق عميقة في الجلد ويحدث ضياع كامل للرؤية. عند استنشـــاق ابخـــرة حـــامض الكبريتـــيك يسبب اختناق شديد في الشعب الهوائية والالتهاب الشـــعبي. حامض الفوسفوريك يهيج للجلد والاغشية المخاطية كما ان ابخرته تسبب الكحة وهياج في الحلق. لقد تم تسجيل مركبي البارابين وفوسفات البوتاسيوم من قبل وكالة حماية البيـــئة الامريكـــية علي انهما مواد فعالة لمبيدات افات. لقد تم تعريف كبريتيت الصوديوم علـــي انـــه مادة خاملة في مستحضر Btk الدبيبل 8AF. لقد اشارت احصائيات مرضي الـــربو فـــي امـــريكا ان ١٠% مـــن حالات الربو (حوالي مليون امريكي) يتفاعلون مع الكبريتيـــت SULFITES خاصـــة هؤلاء الناس الذين يعاملون بالاسنتيريودات. اعراض الـــتعرض في هؤلاء الناس ذوي الحساسية للكبريتيت تشمل في العادة الجهاز التنفسي وقد تشـــمل كذلـــك الغثـــيان والاسهال ونقص ضغط الدم وطفح علي شكل بثور جلدية hives وصدمات عصبية وفقد الوعي.

السلوك او المال البيئي Environmental fate:

لا يعــرف الا القلــيل عن الايكولوجيا الطبيعية لبكتريا Bt فهي توجد طبيعيا في العديــد مــن الاراضــي. فــي احدي الدراسات تم عزل Bt من ٧٠% من عينات التربة المــأخوذة من مناطق متفرقة من العالم وكانت ذات وفرة اكثر في العينات التي جمعت من اســيا. اكثر من نصف العزلات لم توصف كاصناف باسيلليس Bt. لقد تم عزل Bt كذلك من اجسام الحشرات واوراق النباتات والبيئات المائية كما انها وجدت في الورق.

- **التربة:** فــي العادة تظل بكتريا Bt ثابتة لفترة قصيرة فقط في الارض. لقد وجد ان نصــف فــترة الحياه الخاصة بالنشاط الابادي ضد الحشرات للبلورات حوالي ٩ ايام. هــذا ولو ان كميات صغيرة قد تبقي لفترة معقولة. اظهرت احدي الدراسات ان اعداد جراثيم Bt تناقصت برتبة واحدة بعد اسبوعان ولكنها ظلت ثابتة لمدة ثمانية اشهر بعد المعاملــة. لايــبدو ان بكتريا Bt تتحرك بسهولة في الارض في احدي الدراسات تم اســتخدام صــنفين من Bt في قطعتان تجريبيتان متجاورتان ووجد عدم حدوث تلوث مشــترك او عــبوري بيــن القطعتين مما يوضح ان Bt لا تتحرك افقيا في التربة. اظهرت دراسة اخري ان Bt لم تسترجع من علي عمق ٦ سنتيمترات بعد الري وان حركتها فيما بعد مكان المعاملة لم يتعدي ١٠ ياردات من المكان.
- **المجمــوع الخضــري:** بكــتريا Bt التــي تســتقر علي السطح العلوي من الاوراق (المعــرض لاشعة الشمس) قد تبقي فعالة لمدة ١-٢ يوم فقط ولكن البكتيريا Bt التي تســتقر علي الاسطح السفلي من الاوراق النباتية (محمية من ضوء الشمس) قد تبقي لمــدة ٧-١٠ ايام. من الممكن ان تكون هذه البكتريا اكثر ثباتا. لقد تم استراجاع Btk من المجموع الخضري لاشجار البيسية البيضاء بعد سنة من المعاملة. اظهرت احدي الدراســات فــي اليابان ثبات Bt لمدة سنتان في بساتين اشجار الموالح مع احتفاظها بالسمية علي الديدان.
- **الماء:** لقد تم استرجاع Btk من الانهار والنظم العامة لتوزيع الماء بعد الرش الجوي لمستحضــر الثوروســيد 16B. عملــيات معالجة الماء القياسية ليست كافية لتحطيم جراثــيم Btk. الجراثيم والبللورات ترتبطا بسهولة علي الرواسب في عمود الماء مما يقلــل مــن كفاءتهــا بجعلهــا غير ميسرة ليرقات البعوض والذباب الاسود. في احد الاختــبارات تم اضافة Bti للماء ثم سمح لها بالتلامس مع جسيمات الطين. لقد وجد اكثر من ٩٩% من جراثيم Bti في الطين عما هو الحال مع الماء بعد ٤٥ دقيقة. لقد

احتفظـت Bt بحيويـتها وسـميتها لحوالي ٢٢ يوم علي الاقل مسببة قتل ٩٠% من يـرقات البعوض عندما رج الطين وتم ادخال الي الماء في العمود. في تجربة اخري تـم استرجاع الخلايا الحية من الماء حتي ٢٠٠ يوم وفي الرواسب حتي ما يزيد عن ٢٧٠ يوم بعد المعاملة.

- **الهواء:** لقد وجد ان Btk يمكن ان تنجرف لما يزيد عن ٣٠٠٠ متر في اتجاه الرياح خـلال الـرش الجـوي. تعتمد المسافة التي تنجرف اليها Btk علي كمية وطريقة المعاملـة. وكذلـك الظروف المناخية. لقد تم قياس الباسيلليس ثورينجنسيز في الهواء حتي ١٧ يوم من المعاملة.

التكنولوجـيا الحيوية Biotechnology: من الامثلة الخاصة بالمناورة بالوسائل الوراثية genetic manipulation والهندسة الوراثية genetic engineering ما يلي:

١. فـي المنـتج الزراعـي Foil ثـم نقل جين التوكسين الفعال ضد الخنافس خلال الارتـباط conjugation (الـتكاثر الجنسي في البكتريا) الي خلية بكتريا Btk التي تؤثـر فقـط علـي ابي دقيقات والفراشات. اظهرت الخلية الناتجة صفات ابادية ضد الحشـرات الخـنافس وابي دقيقات والفراشات. حيث ان وكالة حماية البيئة الامريكية EPA تعتـبر الكائـنات التـي تنتج من الارتباط في اتجاه المناورة الوراثية عما هو الحال مع اتجاه الهندسة الوراثية. لقد سجل مستحضر Foil في امريكا عام ١٩٩٠.

٢. خلايـا بـسيدوموناس فلوريسنيس يمكن ان تهندس وراثيا لانتاج البيتا-اندوتوكسين دون انـتاج الجراثـيم. بروتيـن البللورة يظل داخل بكتريا البسيدوموناس في جدار الخلية. في منتجات M-Trak, MVP يتم قتل خلايا بسيدوموناس فلوريسنيس بعد ان تنتج بللورات البروتين. عندما يستخدم المركب فان الدلتا-اندوتوكسين تحتفظ بفعاليتها داخـل جدار الخلية الميتة لفترة اطول مرتان او ثلاثة من مستحضرات Bt. لقد كانت M-Trak, MVP كانـت مـن اوائل المنتجات المهندسة وراثيا التي سجلت من قبل الوكالة EPA حيث ان الكائن المهندس وراثيا transgenic لا يكون حيا عندما ينشر في البيئة.

٣. بكـتريا Bti التي تستخدم في مكافحة يرقات البعوض والذباب الاسود التي تعيش علي سطح الماء تبدأ في الغوص بعيدا عن اليرقات المستهدفة خلال ٤ ساعة. البكتريا

التـــي تعـــيش طبيعـــيا علي سطح الماء (في نفس بيئة البعوض والذباب الاسود) تم هندسته وراثيا لانتاج بللورات روتينات Bti.

٤. لقد تم هندسة ما يزيد عن ٣٠ محصول مختلف لانتاج بللورات بروتين الباسيلليس Bt مـــن خلايا التراكيب النباتية. أي افة تتغذي علي أي جزء من هذه النباتات سوف تـــتعرض للدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt وسوف تقتل الافراد الحساسة للتوكسين. من الواضـــح ان امكانيات الهندسة الوراثية للدلتا-اندوتوكسين لبكتريا Bt تبدو لا نهائية. مـــازال الباحثين علي معرفة ودراسة قليلة عن ايكولوجية والثبات الوراثي لبكتريا Bt لذلـــك فان التاثيرات الايكولوجية المؤثرة لهذه الكائنات المتحولة وراثيا يستحيل التنبؤ بها بشكل مؤكد.

المقاومـــة Resistance: لقد اعتقد العلماء في مرحلة من المراحل ان كيفية احداث الفعل فـــي بكـــتريا الباسيلليس Bt معقدة بما فية الكفاية بما يمنع تطور المقاومة في الحشرة. بعد ذلـــك اتضـــح مع الوقت ومن نتائج العديد من البحوث ان هذا الاعتقاد غير صحيح. لقد تم دراســـة ٨ انـــواع من الحشرات بسبب قابليتها لتطوير المقاومة لبكتريا Bt. فراشة الدقيق الهندية وهي افة تصيب الحبوب المخزونة في اماكن كثيرة من العالم وقد كانت اول حشرة طـــورت مقاومة لبكتريا Btk في التجارب المعملية. لقد تطورت وتقدمت البكتريا بسرعة فـــي التجارب المعملية عما هو الحال مع الظروف الحقلية بسبب الضغط الانتخابي العالي فـــي المعمل. لم تظهر اية دلائل تشير الي تكون المقاومة ضد Bt في الحشرات في الحقل حتـــي لوحظت المقاومة في الفراشة ذات الظهر الماسي في الزراعات التي تم فيها تكرار اســـتخدام الباســـيلليس Bt. مـــنذ ذلك الحين لوحظت المقاومة في المعمل في دودة براعم الدخـــان وخنفســـاء كلـــورادو الـــبطاطس وغيرها من الانواع الحشرية. اظهرت الفراشة الفجـــرية ميل كبير لتطور المقاومة لبكتريا Bt. لبعض الحشرات مثل الفراشة ذات الظهر الماســـي ودودة بـــراعم الدخان اظهرت مقاومة لسلالات عديدة من الباسيلليس. لقد حدث ويحـــدث تطور سريع تجاه المقاومة عندما استخدمت او تستخدم كميات كبيرة من المبيد ، لذلـــك فان استخدام النباتات الحقلية المهندسة وراثيا لانتاج توكسين Bt سوف يزيد من عدد الحشرات المقاومة للباسيلليس.

التاثيرات الايكولوجية لبكتريا Ecological impacts :Bt

بعض اهم النواحي الاكثر خطورة في طريق الاستخدام العريض للباسيلليس كوسيلة لمكافحة الافات جاءت من التاثيرات التي قد تحدثها علي الحيوانات بخلاف الافة المستهدف مكافحتها. كل منتجات الباسيلليس Bt تستطيع قتل الكائنات الاخري غير المستهدفة. من ناحية اخري فان الحيوانات التي تعتمد علي هذه الكائنات الحية للتغذية يمكن ان تتاثر كذلك.

**** الحشرات النافعة:** العديد من الحشرات ليست افات كما ان أي برنامج او اسلوب لادارة التعامل مع الافات يحتاج لاهتمامات خاصة تحافظ علي كل ما يطلق علية الكائنات او الاحياء النافعة مثل الحشرات التي تتغذي او تفترس الافات الحشرية. لقد وجد ان بكتريا Bt ذات تاثيرات ضارة علي الانواع النافعة. مثال ذلك ما توصلت اليه الدراسات علي الدبابير التي تتطفل علي فراشة الحبوب "بلوديا انتر بنكتلا" من ان المعاملة ببكتريا Bt تقلل من عدد البيض الذي ينتجة الدبور وكذلك نسبة الفقس في البيض الموضوع. انتاج وفقس البيض في البق المفترس تناقص كذلك. لقد حدث نقص في اعداد الذباب الاكل للمن من جراء المعاملة بمستحضر الديبيل. لقد احدث كلا Bt تينبيريونيس والديبيل موت للاكاروسات المفترسة. لقد احدث الديبيل كذلك موت لفراشة السينابار. التي تستخدم في المكافحة الحيوية لحشيشة تالنسي راجورت. كذلك وجد ان Bti تسبب الموت في فراشة synclita obliteralis التي تقضي علي الحشائش المائية في فلوريدا

**** حشرات اخري:** العديد من الحشرات التي ليس لها منفعة مباشرة في الزراعة تكون ذات اهمية في وظيفة وتركيب النظم البيئية. لقد اوضحت العديد من الدراسات ان تطبيقات Bt قد تحدث خلل في مجتمعات الحشرات. لقد اوضحت البحوث بعد التطبيقات الواسعة لبكتريا Bt لقتل يرقات الفراشة الفجرية في مقاطعة لين بولاية او ريجون. ان عدد الانواع التي تتغذي علي يرقات البلوط نقصت علي مدي ثلاث سنوات بعد الرش. حدث نفس النقص في اليرقات التي تتغذي علي فروع الدخان بعد استخدام Btk لمكافحة دودة البراعم في اوريجون. في المناطق غير المعاملة كانت عدد الانواع النافعة اعلي بمقدار ٣٠% واليرقات زادت بمقدار ٥٠% عما هو الحال في المساحات المعالجة ببكتريا Btk بعد اسبوعين من المعاملة واستمر نقص اليرقات في المناطق المرشوشة في الصيف التالي. لقد تاثرت الحشرات المائية كذلك من جراء المعاملة ببكتريا Bt. لقد اظهرت الدراسات في كندا ان بعض الحشرات في النباتات المائية (سيموليوم فيتاتم....) قتلت بواسطة استخدام

مستحضـــرات الثوروســيد والديبـــيل. لوحـــظ ان العديد من انواع الهاموش قتلت بسبب الاستخدام المتكرر لمستحضرات بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز الاسرائيلية.

** **الطـــيور:** حيـــث ان العديد من الطيور التي تتغذي علي الديدان وغيرها من الحشرات تـــتاثر وتضار ببكتريا Bt لذلك لا يكون مستغربا حدوث تاثيرات ضارة علي الطيور. لقد تم توثيق هذه الاضرار ففي ولاية اوريجون كمثال وجد ان الطيور التي توجد اعشاشها في المـــناطق المعاملـــة ببكـــتريا Bt تحضر اعداد قليلة من الديدان للعشوش بالمقارنة بنفس الطـــيور في المناطق غير المعاملة ببكتريا الباسيلليس. الطيور عندها مقدرة لايجاد اطعمه اخري ومن ثم لا تحدث اضرار علي نجاح العشوش. في نيوهمشاير وعندما ادت المعاملة ببكتريا الباسيلليس الي خفض تعداد الديدان قلت محاولات الطائر الازرق ذو الحلق الاسود فـــي اقامـــة العشوش كما كانت الديدان التي يحضرها للصغار قليلة. هناك بعض الادلة ان بكـــتريا Bt تحدث تاثيرات سامة مباشرة علي الطيور. لقد اظهرت تجارب الديبيل حدوث خفـــض بمقدار ٥٠% في فقس بيض المعاملة بالديبيل. حيث ان الديبيل يستخدم مع المادة الناشـــرة/اللاصقة بليلك plyac فان نقص فقس البيض قد يرجع الي البيلياك وليس للبكتريا Bt نفسها.

** **حـــيوانات اخـــري:** حيـــث ان حيوان الذبابة shrews يتغذي في الغالب علي الديدان الحشـــرية فـــان حدوث ضرر من جراء استخدام ومعاملات Bt واردة ومستحبة. اظهرت احـــد الدراسات في شمال كندا (اونتاريو) ان المعاملة بمستحضر الديبيل غيرت من تركيب مجموع حيوان الذباب لقد حدثت هجرة للذكور البالغة مما ادي الي زيادة نسبة الصغار أي الشـــباب. لقـــد حـــدث تحول في تغذية الشباب. لقد حدث تحول في تغذية الشباب والاناث الـــبالغة الـــي اطعمة بديلة عن ديدان الحشرات. اتضح ان مستحضر Foray 48B عندما يســـتخدم بتركيز عالي (حوالي ٣%) تحدث سمية حادة لاسماك السلمون وربما يكون ذلك بســـبب الحموضة العالية للمنتج. معاملات Bt قد تؤثر كذلك علي حيوانات اخري فقد ثبت ان التركـــيزات الواطـــية من اندوتوكسينات Bti تحدث نقص في وزن فراخ الضفادع كما تؤخـــر من تطورها. مستحضر Bti المسمي فيكتوباك ذات سمية حادة علي اسماك المينوه وقد يرجع ذلك الي الشوائب الموجودة في المستحضر والتي تسبب نقص الاكسجين المذاب فـــي المـــاء. مستحضر Bti المسمي "تكنار" يحدث سمية حادة علي اسماك السلمون بسبب الزيلين المستخدم كمادة خاملة في المستحضر

مقارنـــة المبيدات الحشرية المخلقة: حيثما اجريت مقارنة يتضح ان الاضرار الايكولوجية لمعاملـــة بكتريا Bt غالبا اقل من المبيدات الحشرية التقليدية المخلقة (مثل الكارباريل الذي يقتل العديد من المفترسات).

بروتوكولات تقييم فعالية المبيدات الحيوية

تجدر الاشارة الي ان المبيدات الحيوية ابطأ عادة في تاثيرها عن المبيدات الكيميائية ولذلك قد يلزم تكرار الاستخدام علي فترات متقاربة، وفي كافة الاحوال يجب تسجيل تعداد الافة ومستوي الاصابة موضع الدراسة قبل بدء استخدام المبيد الحيوي مباشرة وعلي فترات دورية قبل كل معاملة ثم بعد فترات بعد اخر استخدام للمبيد الحيوي. ويقيم الفعل النهائي للمبيد الحيوي علي اساس تعداد الافة بعد اخر استخدام للمبيد الحيوي وعلاقته بتعداد الافة ومستوي الاصابة قبل بدء الاستخدام. ويراعي تسجيل كافة الملاحظات والبيانات العلمية عن تاثير هذه المبيدات الحيوية علي الكائنات الاخري غير المستهدفة خاصة عناصر المكافحة الحيوية المتواجدة في المساحة التجريبية والحشرات النافعة.

ويراعي توافر الشروط التالية في المبيد الحيوي الذي يجرب تحت الظروف المصرية:

١. يجب ذكر كافة المعلومات عن المبيد الحيوي متضمنة الكائن الفعال والسلالة – ان وجدت – والنوع والجنس ومكان عزلة والتوثيق العلمي لتعريفة ومستندات التوثيق والجرعة ومدة الصلاحية وشروط التخزين ونظام الاستخدام وكيفية التقدير في النظم المختلفة. وفي حالة وجود خليط من العزلات يجب ذكر بيانات كل سلالة علي حدة والتاكد من ان كل سلالة تنطبق عليها كافة الشروط السابقة.

٢. يكون المبيد واضح التخير ولا يكون له سلالات ممرضة لكائنات اقتصادية ونافعة في الوسط البيئي مثل النباتات الاقتصادية – عناصر المكافحة الحيوية – الحشرات والحيوانات النافعة – الكائنات الدقيقة النافعة للتربة ولا يحتوي علي كائنات دقيقة اخري ممرضة وضارة للنظم البيئية.

٣. ان يكون مستحضر المبيد الحيوي خالي من أي مواد سامة مضافة او اية كيماويات ضارة بيئيا – مثل المبيدات بانواعها او منظمات ومنشطات النمو للكائنات الحية.

٤. لا يفرز سموما جهازية تتسرب الي غذاء الانسان او الحيوان من خلال النباتات المعاملة.

٥. يسهل تنمية الكائن الحي الفعال للمبيد الحيوي علي بيئات متوافرة غير مكلفة.

٦. نظرا لاختلاف سلوك الكائنات الحية في النظم البيئية المختلفة فانة يجب قبل بدء التجريب الحقلي للمبيد الحيوي في مصر فانة يجب اجراء التجارب تحت ظروف المعمل او الصوبة او الحقل المحدود بالجهات البحثية المتخصصة لتقييم ما يلي:

أ. القدرة الممرضة للمبيد الحيوي علي النباتات الاقتصادية في الوسط البيئي.

ب. القـــدرة الممرضة للمبيد الحيوي علي عناصر المكافحة الحيوية (المتطفلات – المفترسات).

ج. القدرة الممرضة للمبيد الحيوي علي الحشرات النافعة (مثل نحل العسل – دودة الارض – الثديـيات). اضـــافة الي ذلك يتم دراسة التاثير علي الكائنات الدقيقة النافعة في التربة.

يـــتم التوصية بالمبيد الحيوي بعد اجتيازة لمراحل الاختبار طبقا للبروتوكول الخاص بالافة المستهدفة.

الباب الثامن

النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز BT (التقدم والمنظور)

النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات
بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز Bt (التقدم والمنظور)

مقدمة: منذ أربعين عاما ارتبط المفهوم العام للمكافحة البيولوجية للآفات باستعمال الأعداء الطبيعـــية من طفيليات ومفترسات ومسببات أمراض للسيطرة على مجاميع الآفات. قد تقيد الجانب الأكبر من ممارسات تلك المكافحة الكلاسيكية باستيراد وتوطين هذه الوسائل. غير ان المكافحـــة البيولوجـــية اتخذت فى السنوات الأخيرة معنـــى اكثر شمولية حيث أدمجت العناصـــر البيولوجية التقليدية باتجاهات جديدة تتضمن منظمات النمو الحشرية، الجاذبات، المعقمات، الاستخدام المتقن للفورمونات الجنسية الجاذبة أو التي تحدث تشويش فى التزاوج ومقاومة النبات للإصابات بالآفات الحشرية وغيرها.

فـــى مجـــال مكافحة الآفات الزراعية، تشكل مسببات الأمراض أهم بديل للمبيدات الكيميائـــية التقلـــيدية حيـــث تعمل مستحضراتها عند التطبيق بوسيلة تماثل وسيلة المبيدات الكيميائية للسيطرة على الآفات على النبات القائم بالحقل. كما تستخدم بالتوافق مع المبيدات الأخـــرى، وغيرها من الإجراءات الأخرى للمكافحة، كجانب من الإدارة المتكاملة للآفات. فـــى هذا المجال قد تؤدى هذه الوسائل دورا فعالا فى مكافحة سلالات الحشرات المقاومة للمبيدات، وقد تتغلب مبكرة على ظهور صفة المقاومة فى الآفة. لدفع المبيدات الميكروبية فـــى السوق التجاري، تبذل حاليا مجهودات من قبل مؤسسات علمية وتجارية للتغلب على سلبيات هذه المركبات بسبب تدهورها السريع، وعدم دوام تأثيرها بالحقل، وإنتاجها المكلف. يبدو ان النجاح قريب بسبب تقدم علم البيولوجيا الجزيئية، والإمكانيات من علم التكنولوجيا الحـــيوية. كمـــا فـــتح علم الهندسة الوراثية آفاقا جديدة فى المجال. هناك محاولات لعزل الجينات المسئولة عن تكوين البللورات السامة للبكتريا الممرضة للحشرات Bt وزرعها فى أنســـجة بعـــض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية، والتي تتعرض لآفات حساسة لهذا النوع البكتـــيري. فقـــد نقلـــت الجينات أولا الى نوع بكتيري اخر يتبع جنس اجروبكتيريوم ذى القـــدرة علـــى غزو أنسجة النبات لتوصيل الجينات المراد نقلها الى أنسجة النبات. تتم هذه الخطوة باستخدام مزارع الأنسجة حيث يجرى بعد ذلك تنمية النبات المهندس وراثيا، والذي ســـوف تكون لخلاياه القدرة عندئذ على إنتاج البللورات السامة، وبذلك تصبح أنسجة النبات المهـــندس وراثـــيا ذاتها سامة للحشرة إذا ما تغذت عليها. كانت التجارب الأولى على هذا الأسلوب قد نجحت على نباتات التبغ فى أمريكا بهدف مكافحة دودة براعم التبغ.

غـير ان هـناك نقاط عديدة تنتظر التوضيح مثل قدرة النباتات المنتجة وراثيا على الحفاظ على صفة المقاومة ضد الآفة من جيل الى جيل، وما إذا كانت الحشرة نفسها سوف تكتسـب مقاومـة ضد فعل البللورات السامة عند تغذيتها جيلا بعد جيل على هذه النباتات وكذلك الأمان الصحي والبيئي لهذه النباتات المقاومة الواعدة.

البكتيريا المتجرثمة الثورينيجنية (.Bacillus thuringinsis (B.t

فـى حالـة البكتريا المتجرثمة الثورينيجنية تتحرر الجرثومة والجسم البللوري من الجـدار الجرثومي اثر ذوبانه بالعصير الخلوي لمعدة العائل. كذلك يذوب الجسم البللورى بـدوره بفعـل الأنزيمات المحللة للبروتين. تنشأ القدرة المرضية للبكتريا .B.t من إفراز أربعة مركبات سامة تتواجد فى خلاياها، أو فى وسط تكاثرها هي:-

١-أنـزيم الفوسفوليبيز (Phospholipase C= Lecithinase C) المسئول عن اهلاك العائل، ويشار الى هذا الأنزيم بالالفا اكسوتوكسين (B.t.α-exotoxin).

٢-المركـب السام الثاني يسمي بالبيتا اكسوتوكسين (B.t.β-exotoxin) وقد عزل من مـزارع هـذا الـنوع البكتيري ويتركب من أجزاء متساوية من الادينين والريبوز والفوسفور ويوقف تخليق الحمض النووي RNA.

٣-الجاما اكسوتوكسين (B.t.γ-exotoxin) هذا المركب لم يثبت سميته بصفة قاطعة.

٤-المركب السام الرابع المعروف بالدلتا اندوتوكسين (B.t.δ-exotoxin) يتواجد بداخل الجسـم الـبللوري للخلية البكتيرية. يتحمل هذا المركب درجة الحرارة، ويذوب فى المحالـيل القولية. ينشط هذا الاندوتوكسين فى القنوات الهضمية ذات الوسط القلوي مطلقـا المكونات السامة من الجسم البللوري مما يتسبب فى شلل القناه الهضمية فى مـدى دقـائق من تواجد هذا الجسم. يتبع ذلك تساقط خلايا معدة العائل المتفككة فى فـراغ المعـدة ممـا يعـرض غشاءها القاعدي المتهتك لهجمات الخلايا البكتيرية الخضرية واختراقها له ووصولها الى دم العائل.

كمـا ذكـر سـابقا بان هناك محاولات تمت واخري مازالت جارية لعزل الجينات (ICP genes) المسـئولة عن تكوين البللورات السامة (ICPs) Insecticidal crystal proteins للبكتـيريا الممرضـة للحشرات .B.t وزرعها فى أنسجة بعض النباتات ذات الأهمـية الاقتصـادية، والتـي تتعرض لآفات تصاب بهذا النوع البكتيري حيث يتم نقل الجيـنات أولا الى نوع بكتيري اخر يتبع جنس Agrobacterium ذي القدرة على غزو أنسـجة النـبات وهـو فى هذه الحالة يعمل كحامل لتوصيل ال ICP genes الى أنسجة

النبات. ومن ثم تصبح هذه النباتات المهندسة وراثيا لها القدرة على إنتاج البللورات السامة (ICP) وبالتالي تصبح أنسجة هذه النباتات سامة للحشرة إذا ما تغذت عليها.

الهندســة الوراثــية والتكنولوجــيا الحيوية النباتية فتحت العديد من الفرص لتحسين النــباتات بتقديم حلول جديدة للمشاكل المستعصية منذ زمن بعيد. من أكبر العوامل الكبرى غــير الثابــتة التي تؤثر على إنتاجية المحاصيل تلك التي تعنى بالإصابة بالحشرات. الفقد الشامل العالمي من الآفات الحشرية يصل لحوالي ٢٠ – ٣٠% من جملة الإنتاج الزراعى بالــرغم من استخدام وسائل حماية النباتات التي تشمل المبيدات الحشرية الفعالة (James وآخــرون، ١٩٩١). لقــد أدى الاستخدام المكثف للمبيدات الى ظهور مشاكل خطيرة من جراء الانهيار البيئي وصحة الإنسان . الهندسة الوراثية للنباتات لتحقيق المقاومة للحشرات تمــثل فرصة جذابة لتقليل الضرر الذي تحدثه الحشرات ومن ثم تقلل من استخدام مبيدات الأفــات (Kumar and Sharma، ١٩٩٤). جزئــيات المبيدات الحشرية الفعالة يمكن أن توجــد فــى كائنات حية متنوعة والتي إذا أنتجت بتركيز فعال فى النباتات يمكن أن تحدث مقاومــة للحشرات. فى الحقبة الزمنية الأخيرة تم تحقيق نجاح مشهود فى تطوير النباتات المقاومــة للحشــرات ممــا أدى الى بداية التسويق التجاري للنباتات المهندسة وراثيا عام ١٩٩٦ (Krattiger، ١٩٩٧). لقد تم إختبار مجموعة من الجينات المشفرة لأقسام مختلفة من البروتينات ذات التأثيرات كمبيدات حشرية مثل مثبطات البروتييز والليكتينات ومثبطات الأميلييز وتوكسينات فينوم العقرب وأنزيمات التخليق الحيوي للسيتوكينينات والكوليسترول اكســيديز والكتيتــيز والجامــا إندوتوكســينات للباسيلليس ثورينجينسيز (Bt) فى مكافحة الحشرات. من بين هذه البروتينات ما يختص بالبروتينات البللورية التي تبيد الحشرات من بكــتريا Bt والتــي أظهرت اقتدار وكفاءة عالية بسبب كفاءتها والتخصص على الحشرات ونقــص النشاط فى الثدييات وغيرها من الكائنات الحية. فى هذا المقام سوف تناقش التقدم الحديث الذي تحقق فى تطوير النباتات المحورة وراثيا باستخدام جينات Bt .

A.D. Mandaokar , P. Anand Kumar , V.S. Malik and R.P.Sharma**
National Research Center on Plant Biotechnology , Indian Agricultural Research Institute , New Delhi 110012 , India
**APHIS United States Department of Agriculture , 4700 River Road , Riverdale , MD 20737 , USDA .*

الفصل الأول
أساسيات الحصول على النباتات المهندسة وراثيا
بجينات توكسينات بكتريا Bt

البروتينات القاتلة للحشرات فى بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز

بكـتريا الباسيلليس ثورينجينسيز عبارة عن بكتريا تسكن التربة موجبة لجرام وهى تنـتج بلـورات داخلـية عند التجرثم. فى بدايات القرن العشرين وجد أن هذه البكتريا لها تأثيرات إبادية على الحشرات (Berliner، ١٩١٥). بعد سنوات تم الكشف عن ان نشاطها وفعلهـا علـى الحشـرات يـرجع الى بروتينات موجودة فى البللورات وقد أطلق عليها بروتينات بللورية كمبيدات (ICPs) " insecticidal crystal proteins". منذ ذلك الوقت اسـتخدمت سـلالات Bt والجراثـيم والـبللورات و ICPs كمبـيدات حشرية حيوية فى مستحضـرات تجاريـة. التخصصية والأمان البيئي لمبيدات الحشرات Bt حفزت البحوث لسلالات Bt جديدة تنتج توكسينات ضد آفات حشرية أكثر. سلالات مبيدات Bt فعالة ضد حشـرات حرشفية الأجنحة وغمدية وثنائية الأجنحة (Hofte and Whiteley، ١٩٨٩). بالـرغم مـن التجانس الكبير الذي وجد بين الجينات التي تشفر مختلف البروتينات السامة TCPs لقسـم خاص من الحشرات فان الحساسية فى حشرات خاصة لناتج جين Bt قريب فى الغالب تكون مختلفة جدا (Van Frankenhu zen، ١٩٩٢). بلورات مبيدات Bt (Cry) البروتينـية تـم تقسـيمها الى ١٧ عائلة (جدول ٨-١) بناء على تركيب الحمض الأميـنى (Crickmore وآخرون، ١٩٩٥). جينات البكتريا Bt والتي شفرت لبروتينات بللـورات المبيدات ICPs أوضحت تجانس قوى فى بعض الأوساط المحفوظة (Bravo، ١٩٩٧). جيـنات مبيدات Bt هذه توجد غالبا على بلازميدات مرتبطة كبيرة وهذا قد يفسر حركتها الملحوظة بين سلالات البكتريا Bt . سلالة واحدة يمكن أن تحتوى على العديد من جيـنات Cry ونفـس الجيـن يمكن أن يوجد فى سلالات عديدة . العديد من ICPs كانت حوالـى ١٣٠ Kda فـى الوزن الجزيئى وتجهز فى المعى الأوسط لصور فعالة ونشيطة للتوكسـينات حوالـى ٦٥ - ٧٥ Kda مـن خلال نهايات ـن فى البروتينات. تحدث هذه التوكسينات سميتها من خلال الارتباط بالخلايا الطلائية للمعى الأوسط ومن ثم تحدث تحلل فى الأسموزية خلال تكوين الثقب فى غشاء الخلية (Gill وآخرون، ١٩٩٢).

لقـد لوحـظ حديـثا أن السوائل الرائقة فى المزارع الرائقة التي تجمع خلال النمو الخضـرى لأنـواع الباسيلليس غنية فى جزيئات المبيدات الحشرية (Warren وآخرون ١٩٩٦، Estruch وآخـرون، ١٩٩٦). السوائل الرائقة لبعض عزلات B.cereus تملك سـمية عالـية ضد ديدان جذور الذرة المعروف عنها مقاومتها للبروتينات ICPs. صفات الإبـادة ضـد الحشرات ترتبط بنظام مزدوج يطلق على نوعى البروتين Vip1 , Vip2 (بروتين خضرى للمبيد). على نفس المنوال فان السائل الرائق لبعض مزارع بكتريا Bt له صـفات ابادية عالية ضد الحشرات مثل الدودة القارضة والحفارات (Estrueh وآخرون، ١٩٩٦). لقـد أظهـرت كلونة وتوصيف الجين بروتين جديد كمبيد حشرى وهو Vip3A وهـو غـير مـتجانس مع أى بروتين معروف. التتابع الطرفي للنتروجين N-terminal لبروتينات Vip تملك عدد من البقايا المشحونة موجبا متبوعة بمنطقة ثقب كاره للماء وهو مشابه لأية إشارات ببتيدية وصفت لبكتريا باسيلليس (Estruch وآخرون، ١٩٩٦). Vips خاص Vip3A تحدث نشاط ابادى ضد الحشرات خاصة حرشفيات الأجنحة. لقد أوضحت دراسـات المرضـية التشـريحية للحشـرات الحساسة التي تغذت على غذاء مضاف إليه Vip3A حـدوث شلل فى الأمعاء يتبعه تحلل كامل للخلايا الطلائية فى الأمعاء مما يؤدى الـى مـوت الـيرقات (Yu وآخرون، ١٩٩٧). لقد لوحظ انهيار كامل للخلايا الطلائية العمادية.

جـــدول (٨-١) : المجامـــيع الأولـــية للاندوتوكسينات فى الباسيلليس ورينجنيسز وتخصصها الابادى ضد الحشرات

البروتين ICP	التخصص Specificity	البروتين ICP	التخصص Specificity	البروتين ICP	التخصص Specificity
Cry1A(a,b, c,d,e)	L	Cry2A(a,b,c)	L,D	Cry9Aa	L
Cry1Ba	L,C	Cry3A	C	Cry9Ba	L
Cry1C(a,b)	L,C	Cry3B(a,b)	C	Cry9Ca	L
Cry1D(a,b)	L	Cry3Ca	C	Cry10Aa	D
Cry1E(a,b)	L	Cry4Aa	D	Cry11Aa	D
Cry1Fa	L	Cry4Ab	D	Cry12Aa	N
Cry1Ga	L	Cry5A(a,b)	N	Cry13Aa	N
Cry1Ha	L	Cry6A	-	Cry14Aa	C
Cry1I(a,b)	L,C	Cry7A(a,b)	C	Cry15Aa	-
Cry1Ja	L	Cry8Aa	C	Cry17Aa	-
		Cry8Aa	C	Cry17Aa	-
		Cry8Ca	C		

نيماتودا ، غمدية الأجنحة ، ثنائية الأجنحة ، حرشفية الأجنحة

إدخال الجينات المسئولة عن تكوين البللورات السامة (ICP genes) داخل النباتات:

فـــى أول الأمـــر أثبتـــت النـــباتات ان قابليـــتها للـــتعديل الوراثي اقل كثيرا من المـــيكروبات. علـــى ان هناك الآن عدة طرق متاحة لذلك، أكثرها استخداما يتأسس على بكـــتريا اجروباكتـــيريام تيوميفاســـينس Agrobacterium tumifaciens وهى نوع من البكتـــيريا يسبب أوراما على كثير من النباتات الزهرية تسمى التدرن التاجي. هذه البكتريا تحوي بلازميد يطلق عليه الورم (م و) وهو يسمى هكذا لانه عندما ينقل الى كروموزومات نـــبات يحدث فيه العدوي ومن ثم يصبح نمو النبات نموا مختلا. لقد حرص علماء الوراثة على تعديل بلازميد محدث الأورام (م و) لهذه البكتريا لخدمة أهدافهم الخاصة. فهم يزيلون مـــن البلازمـــيد جيناته المحدثة للورم ويدمجون بدلا منها جينات البللورات السامة (ICP genes) التـــي تؤخـــذ من بكتيريا B. thuringiensis، وبهذا فانهم يستخدمون البلازميد كـــناقل يولجون معه داخل النباتات العديدة من الجينات الجديدة المرغوبة لتحقيق المقاومة النباتية ضد الآفة أو عامل الإجهاد تحت التناول.

أحـــد الملامـــح الرئيسية لتحوير النباتات وراثيا هي نباتات بأكملها من خليه واحدة. فمـــثلا فـــان خليه واحدة من ساق نبات التبغ يمكن استنباتها لتجديد إنماء النبات كله. هذه العملـــية من التكاثر الخضري (زراعة الأنسجة) هي ما يمكن تشبيهه ببستاني قد اخذ شتله مـــن أحد الأنواع المرغوبة. على ان عالم الوراثة يستطيع إدخال جينات الى هذه الخلايا ثم يسمح للخلايا بالتكاثر ثم ينتج الآلاف من النباتات المحورة وراثيا.

لقـــد تمكـــن كثير من العلماء باستخدام بكتيريا A.thumifaciens من إنتاج بعض النـــباتات المحـــتوية على الـــICP genes. من هذه النباتات القطن، الطماطم، البطاطس، البرســـيم والـــذرة والتي أصبحت تزرع على نطاق واسع في بعض البلدان مثل الولايات المتحدة الأمريكية.

هـــناك طـــرقا اخـــرى لوضـــع جينات جديدة داخل النباتات غير استخدام ال A. tumifaciens مـــثل: الإدخال المباشر لل DNA في بروتوبلاستات عارية اى في خلايا نباتـــية ينقصـــها جدارها الخارجي المتين، الذي يمكن ازالته بهضمه باستخدام الأنزيمات. هـــناك عملية من التثقيب الكهربى، يتم فيها امرار تيار كهربى نابض خلال خليط من الـــDNA ومـــن البروتوبلاست. ويفتح التيار الكهربي ثقوبا دقيقة فى الخلايا تسمح بدخول ال DNA الـــذي يمكـــن ادماجه بعدها في النواة. رغم ان البروتوبلاستات هشة الا ان جدار الخلية قد ينمو مرة ثانية خلال يوم أو ما يقرب ويمكن بعدها استنبات الخلايا المعدلة لتنتج نباتات بأكملها تحمل الجينات المنقولة.

النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt-transgenic plants

فى أكثر النظم الفعالة التي نشرت ونزلت للأسواق النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباســـيلليس ثورينجينســـيز Bt. النظم الأخرى مثل البكتريا Bt المحورة وراثيا، الكائنات الدقـــيقة المحـــورة، الفيروسات المتحولة Bt وكذلك مستحضرات Bt تعانى من العديد من العـــيوب الوراثـــية (Kumar وآخرون، ١٩٩٦). التطورات الحديثة فى تكنولوجيا تحول النـــباتات أدت الى مساعدة الادخال الثابت للجينات الغريبة فى العديد من أنواع المحاصيل الهامـــة بما فيها ذات الفلقة الواحدة (Dale وآخرون، ١٩٩٣). لقد نشر أنه تم تحوير أكثر مـــن ٧٠ نـــوع نباتى هامة من خلال الهندسة الوراثية. لقد تأكد عندئذ من الاقتدار العالى للهندسة الوراثية للنباتات بما يمكنها من التعبير عن جينات Bt المزروعة. المميزات الهامة لصفة مقاومة الحشرات التى هندست فى النباتات تشمل:

١. تحقيق حماية طوال الموسم بصرف النظر عن الظروف الجوية.
٢. مكافحة فعالة ضد الحشرات المدفونة والمختبئة والتى يصعب الوصول اليها بالرش.
٣. مكافحة كل أطوار الحشرة.
٤. الحشرات التى تأكل النباتات هى فقط التى تتعرض للتوكسينات. إحداث المقاومة النباتية ذات مردود اقتصادى لأنها تقلل عناصر التكاليف التى يتحملها الفلاح.

المحاولة الأولى للتعبير بالجاما – اندوتوكسينات فى النباتات استخدمت التتابع الأصلى المشفر من بكتريا الباسيلليس Bt. لقد استخدم الباحث Vaeck ومعاونوه (١٩٨٧) محفز المانوباين سينسيز و ٣ منطقة الأدينالين المتعدد لجين T-DNA-7 للتعبير عن جين Cryl Ab S-endotoxin. التراكيب التى فحصت فى الدخان شملت الشرائح الطرفية -NH2 التى تشفر ٦٠ حامض أمينى وتركيبين يشفرا انطلاق الترجمة بين شرائح نهايات ن٢يد للكراى 1Ab وجين npt II. مستويات الجاما – اندوتوكسين التى تم التعبير عنها فى النباتات المحتوية على البروتينات العارية أو بروتينات الانتشار تتراوح من ٢,٦–١٩٠ نانوجرام كريل Ab1/مللجم بروتين ذائب أو ٠,٠٠٠٢ – ٠,٠٢% من البروتين الكلى الذائب. لقد قام Barton وآخرون بتحليل التعبير الخاص بجين الكريل A1 الأصلى فى الدخان باستخدام الجين كامل الطول والجين عديم الأذرع المشفر لبروتين الحمض الأمينى ٦٦٤. كلا الاقترابان استخدما المنشط CaMv35S , UTL – 5 لفيروس موزايك البرسيم RNA ومنطقة النوبالين سينسيز عديدة الأدينالية. لم يوجد نبات واحد من تلك التى حولت وراثيا بالجين كامل الطول ينتج مستوى يمكن الكشف عنه من بروتين Bt. تحليل بلوتات نورثرن لهذه النباتات أوضح وجود أنواع mRNA أقصر من النسخ من الجين كامل الطول مع شرائح أقصر مميزة ووجود mRNA غير الكاملة فى النباتات المتحولة وراثيا ترجع الى عدم كفاية عمليات ما بعد الاستنساخ أو العودة السريعة للنسخ كامل الطول.

لقد قام Fischhoff وآخرون (١٩٨٧) بتحويل الطماطم مع جين كريل Ab1 الأصلى. لقد استخدم طرازان عديمى الأذرع من الجين واحد يشفر بروتين ٤٦٤ حمض امينى والأخر بروتين ٧٢٥ حمض أمينى . كل طراز أشتق من أو بواسطة محفز CaMV35S و٣- عديد الأدينالية كمنطقة من جين النوبالين سينسيز. التعبير عن شريحة NU2 الطفرة فقط لجين الجاما – اندوتوكسين انتج نباتات ذات نشاط ابادى على الحشرات. كذلك أدى إدخال الكريل Ab – nptII فى نباتات البطاطس الى تحقيق نشاط ابادى قليل ضد الحشرات (cheng وآخرون، ١٩٩٢). لقد تم إدخال جين نشيط كريل III يبدأ من

الحمــض الأمينى ٤٨ فى نباتات الطماطم والبطاطس . لقد كانت مستويات التعبير فى هذه النباتات قليلة جداً اى أقل من ٠,٠٠١% من البروتين الذائب الكلى. لقد أوضحت الدراسات الــتى أجريت على نباتات الطماطم والبطاطس المتحولة وراثيا مع نهايات NH2 لجين Bt كــريل Ab I أن نباتات الطماطم المتحولة أنتجت حوالى ٥٠ نانوجرام كريل Ab 1 لكل جــرام مــن نسيج الورقة (Fischhoff وآخرون، ١٩٨٧). بينما أنتجت نباتات البطاطس ٩٠-١٥٠ نانوجرام كريل 1Ab لكل جرام من نسيج الورقة (Peferoen، ١٩٩٢).

التعبير عن جين الاندوتوكسين الأصلى كريل 1Ab فى الدخان النامى فى الحقل تم توصــيفه بواســطة Carozzi وآخرون، ١٩٩٢. لقد تم دراسة ستة خطوط دخان مهندسة وراثــيا تعبر عن الحمض الأمينى ٦٤٥ فى بروتين Cry7 Ab من الجين الأصلى عديم الأذرع تحــت سيطرة المحفز CaMV 35 S ومع تتابعات ٣-عديدى الأدينالية. لقد زادت مســتويات الجامــا – اندوتوكسين خلال التطور النباتى مع زيادة محسوسة عند الازهار. مســتويات الكــراى Ab 1 عند الأزهار تراوحت من ٤٠٠ – ١٠٠٠ نانوجرام لكل جرام وزن جــاف أو حــتى ٠,٠١% مــن البروتيــن الذائب الكلى. الحمض النووى mRNA لاندوتوكســين Bt ذات الحجــم المــتوقع تم الكشف عنه بسهولة ولكن كان هناك RNAs متميزة عديمة الأذرع. لقد لوحظ ان النسخ العارى فى النباتات بسبب رسالة أو شفرة عدم ثبات اكثر منها فى حالة النسخ بسبب العمليات غير المناسبة.

إن اســتخدام الكودون فى جينات الجاما اندوتوكسين الأصلية يختلف بشكل كبير عن تلــك الــتى وجدت فى الجينات النباتية الأساسية. الجينات الخاصة بالاندوتوكسين الأصلية تمــيل الى محتواها المخفض من Gtc كما فى الذرة (Murray وآخرون، ١٩٩١). جين الجاما اندوتوكسين عديم الأذرع يستنسخ فى النباتات المهندسة الوراثية قد ينتج من عدد من الأحــداث ترتــبط بمحــتواها العالى من A+T . هذه تشمل إنهاء النسخ غير الناضج أو الدينالية المتعددة في المناطق ذات المحتوى العالى من A+T أو الانقسام غير المناسب أو الوصــل غير المناسب. عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا مع الانهيار النووى الداخلى أو الخــارجى عــند تتابعات خاصة تفقد ثبات الرسالة خلال الاستنساخ أو يخلق توقف مؤقت بســبب تكويــن تركيــبات ثانوية. عدم ثبات mRNA قد يكون ناتجا كذلك من النقل غير الفعال بسبب الاستخدام غير الجيد للكودون.

لكى نوضح المشاكل المذكورة أعلاه ولتحقيق تعبير عالى عن جينات التحول Bt فى النباتات أجريت العديد من المحاولات لتحوير تتابع النيوكلوتيد للجينات الأصلية دون تدخل

فـــى نـــاتج البروتين. فى تصميم الجين المخلق للتعبير فى النباتات يجب أن تؤخذ العوامل التالية فى الاعتبار:

١. التـــتابعات التى تتداخل مع كفاءة تعبير الجينات يجب أن تزال ويتخلص منها. مثل هـــذه التـــتابعات تشـــمل الإشـــارات النباتية العديدة الأدينالية مثل: AATAAA, AATAA, AATATT, GATAAA, AATAAG.

٢. تـــتابع نهايـــة البوليميريز CAN7-9 AGTNNAA II. لقد اتضح أن هذا التتابع يكون تاليا لنهاية 3 فى منطقة التشفير لجينات UZ snRNA هذا هام فى التحوير فى جينات Bt إذا وجد.

٣. إن CUUCGG hairpins مســئولة عـــن الثـــبات غير العادى للتراكيب الثانوية للحامض النووى RNA المرتبطة بمختلف العمليات البيوكيميائية الثبات الاستثنائى لدبابـــيس الشـــعر CUUCGG أدت الى الاقتراح بأنها قد تكون ذات تركيب غير عـــادى وقـــد تكون ذات وظيفة فى تنظيم الثنى المناسب للتراكيب المعقدة للحامض الـــنووى RNA . هـــذه التتابعات التى تؤثر على mRNA وعملياتها فى الخلايا النباتية تحتاج لتحوير.

٤. أماكـــن الوصـــل فـــى النـــبات 5 = AAG : GTAGT و(PU) 3 = TTTT TTT(PU)T(PU)TGCAC:C (حيـــث P = البيوريـــن) قـــد توجد فى جينات الباسيلليس Bt وهذه يجب التخلص منها.

٥. التحويرات فى تتابع النيوكلوتيد لجين Bt الذى يشفر المنطقة قد يعمل لتقليل محتوى A+T فى تركيب الأساس للدنا DNA. بكتريا Bt المخلقة تصمم كى تحتوى على A+T حوالى ٥٠% وهى النسبة التى توجد فى العادة فى النباتات.

٦. عندما يخلق الجين لتحسين التعبير فى خلية عائل غريب يكون مطلوبا تصميم الجين حـــتى نصـــل الى أن تكراريته فى اقترابات استخدام الكودون تقارب تكراريته فى استخدام الكودون المفضل لخلايا العائل.

عـــندما أخـــذت هذه العوامل الستة فى الاعتبار قام علماء شركة مونسانتو بتصميم جيـــنات Bt وأجروا دراسات رائدة للتعبير عن جينات كراى 1Ab وكراى 1Ac المحورة جزئـــيا أو المحـــورة بشكل كامل (مخلقة) من نباتات القطن (Perlak وآخرون، ١٩٩٠، ١٩٩١). لقد زاد مستوى البروتين القاتل للحشرات فى الخلايا النباتية بمقدار ١٠٠ مرة مما أدى الى تحقيق مكافحة فعالة لديدان اللوز (جدول ٨-٢). لقد حدث نفس الشىء مع الجين

المشفر ICP، كراى A III فى البطاطس لتحقيق الحماية ضد الضرر الذى تحدثه خنفساء الكلـورادو (Adang وآخـرون، ١٩٩٣). لقد أمكن تحقيق تحسين فى التعبير عن جين كـراى A III من خلال زيادة محتواه الشامل من G/C من ٣٦% الى ٤٩%. لقد استتبع هذه النجاحات تطوير العديد من المحاصيل المهندسة وراثيا لأنواع من جينات ICP المخلقة تحت سيطرة محفزات مختلفة. لقد تحققت نجاحات فى الذرة والأرز وفول الصويا (جدول ٨-٢). بناء على موافقة وتصريح Ap HIS (فبراير ١٩٩٥) تم السماح بإجراء اختبارات حقلية على ١١ نوع نباتى هندست وراثيا بجينات ICP فى الولايات المتحدة الأمريكية. هذه النباتات التفاح، الكانولا، الذرة، القطن، البطاطس، الأرز، الدخان، الطماطم، اللوز، الحور. فى المستقبل القريب سوف تختبر العديد من الأصناف النباتية المحورة وراثيا.

جدول (٨-٢): النباتات المهندسة وراثيا بجينات Bt المخلقة

Plant	Gene	G+C content (%)	Bt protein content (% of soluble protein)	Target insect	Reference
Cotton	cry1Ab cry1Ac	49	0.1	Heliothis zea Pectinophora Gossypiella	Perlak et al. 1990
Potato	cry3A	49	0.3	Leptinotarsa Decemlineata	Perlak et al. 1993
Maize	cry1Ab	65	0.17	Ostrinia nubilalis	Koziel et al. 1993
Rice (japonica)	cry1Ab	59	0.05	Chilo suppressalis	Fujimato et al.
Rice (indica)	cry1Ac	45	0.025	Scirpophaga Incertulas	Wunn et al. 1996 Nayak et al. 1997
Tomato	cry1Ab	49	0.3	Heliothis zea	Perlak et al. 1991
Tobacco	cry1Ab	49	0.03	Heliothis virescens	Perlak et al. 1991
Eggplant	cry1Ab	59	0.03	Leucinodes Orbonalis	Kumar et al.
Canola	cry1Ac	-	0.4	Plutella xylostella	Stewart et al.
Alfalfa	cry1C	45	0.2	Spodoptera lito0ralis	Strixzhov et al. 1996

تاثــير النباتات المهندسة وراثيا بجينات توكسينات بكتريا Bt على الحشرات الضارة التي تهاجمها:

من المعروف ان بعض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية والتي تبدي مقاومة طبيعية ضـد بعـض الحشــرات فى بيئاتها الأصلية لم تنجح فى مقاومة هذه الحشرات. لذلك لجأ المزارعون لاستخدام المبيدات الكيميائية للحد من أضرار هذه الحشرات. لكن نظرا للآثار السـلبية التـي تحدثهـا هـذه المبـيدات فى البيئة، فقد ظهرت فى الأونة الأخيرة احدى الاسـتراتيجيات السـبديلة والتـي تتمثل فى وضع جينات جديدة داخل هذه النباتات تجعلها مقاومة للآفات.

مـن المعـروف ايضـا ان المستحضرات التجارية لبكتيريا الـB.t. المحتوية على الـبللورات السـامة-لهذه البكتيريا (Bt Cry proteins) بالإضافة الى الجراثيم استخدمت ومازالـت تستخدم رشا لمكافحة بعض الحشرات على المحاصيل المختلفة. وهذه المبيدات الميكروبية تأثيراتها الضارة قليلة على البيئة مقارنة بالمبيدات الكيميائية التخليقية.

مـن هـذا المنطلق اتجه كثير من العلماء فى العقد الاخير من القرن العشرين لنقل الجيـنات المسـئولة عن إنتاج التوكسينات (ICP genes) من بكتريا ال B.t. الى بعض النباتات ذات الأهمية الاقتصادية مثل القطن، التبغ، البطاطس، الطماطم والذرة. بهدف جعل هـذه النباتات قادرة ذاتيا على إنتاج التوكسينات داخل خلاياها وبالتالى تصبح جميع اجزاء النـبات سامة للحشرات التي تتغذي عليها (هذه التوكسينات لا تتناولها الحشرات القارضة فقـط ولكـن تبـتلعها ايضا الحشرات الثاقبة الماصة). لقد اصبحت هنلك اصناف من هذه المحاصـيل المحورة وراثيا مالوفة وتزرع على نطاق واسع فى بعض دول العالم المتقدم كبديل لاستخدام المبيدات السامة لمكافحة الحشرات.

سوف نلقي الضوء على بعض هذه المحاصيل المحتوية على Bt cry genes والتى انتجتها بعض شركات البيوتكنولوجي.

١ – القطن

اكـدت التجارب ان اصناف القطن المهندسة وراثيا بجينات ال Bt (ICP genes) مقاومــة لبعض الحشرات مثل دودة براعم التبغ، دودة ورق القطن الصغري، ودودة اللوز القرنفلـيه، ودودة اللوز الامريكية. حيث ان هذه النباتات اثرت على وزن اليرقات، اطالت فـترة الطور اليرقي، كما انخفض تعداد اليرقات وانخفض وزن وعدد العذارى التي تصل الـي طور الحشرة الكامل بزيادة فترة التغذية على هذه النباتات. علاوة على ذلك فان هذه الجيـنات الجديدة لم تؤثر لا على كمية محصول القطن ولا على صفات التيلة، حيث اثبتت

التجارب ان هذه الاصناف اعطت محصولا عاليا مقارنة بالاصناف الغير محورة وراثيا (العادية).

كما اثبتت الابحاث ان الاختلاف في درجة تاثير اصناف القطن المختلفة المهندسة وراثيا على ديناميكية تعداد بعض حشرات القطن يعزى الى اختلاف مستويات الدلتا اندوتوكسين δ-exotoxin من صنف الى اخر. يضاف الى ذلك ان كمية التوكسين تختلف ايضا باختلاف عمر النبات حيث وجد ان التوكسينات تكون موجودة بمتوسطات عالية داخل نبات القطن فى مراحل النمو المختلفة ثم تبدا فى الانخفاض بمجرد ان يبدأ النبات فى الدخول فى مرحلة الشيخوخة.

اليوم يوجد اصناف من الـ Bt-cotton المنتجة تجاريا والتي تزرع فى بعض دول العالم المتقدم. والتي تساهم فى رفع انتاج القطن وتقلل من استخدام المبيدات السامة التي تدمر البيئة. اصبح انتاج هذه النباتات وزراعتها هو البديل عن استخدام المبيدات الكيميائية فى مكافحة بعض الحشرات حرشفية الاجنحة التي تهاجم القطن وتسبب له ضررا اقتصاديا خصوصا وان كمية المحصول، صفات التيلة، ومحتويات البذرة لهذه الاصناف الجديدة لم تتاثر نتيجة تواجد جين جديد بداخلها.

وبذلك تعتبر اصناف الـBt-cotton من المنتجات المستقبلية التي سوف تقلل من استخدام المبيدات الكيميائية فى انتاج القطن واكثر امانا منها.

٢- البطاطس:

قام بعض العلماء بنقل الـCry V-Bt gene والمتخصص ضد بعض الحشرات الحرشفية والغمدية الاجنحة من بكتيريا ال B.t. الي احد اصناف البطاطس (Spunta) وذلك باستخدام الاجروباكتيريام A. tumifaciens لقد ابدي هذا الصنف مقاومة لكلا من حشرتي فراشة درنات البطاطس وخنفساء كلورادو حيث انخفض تعداد هذه الحشرات نتيجة تغذيتها على نباتات هذا الصنف. هذه المقاومة التي ابداها هذا الصنف ضد هذه الحشرات كانت افضل من استخدام المستحضر البكتيري رشا كل اسبوع او استخدام مبيد البيرمثرين رشا كل اسبوعين او حتي معاملة البطاطس بمبيدات جهازية فى بداية ومنتصف الموسم.

٣- الذرة:

فـــي حيـــن ان بكتـــيريا الاجروباكتيريام لها القدرة على عدوي نباتات ذات الفلقتين (فكانـــت تستخدم فى نقل Cry Bt gene الى هذه النباتات) الا انها لا تهاجم طبيعيا ذوات الفلقـــة الواحـــدة مثل الحبوب مع ان الحبوب هدف رئيسي للتحسين الوراثي. نظرا لاهمية الحـــبوب فقـــد انبثقت طرائق بديلة لنقل الجينات مثل .. الادخال المباشر للـــ DNA فى الخلايا النباتية، ثم باستخدام زراعة الانسجة يتم استنبات الخلايا المعدلة لتنتج نباتات باكملها تحمل الجينات المنقولة.

فـــي حوالي نهاية الثمانينات كانت هناك جماعات بحث مختلفة مشغولة كلها بالعمل من اجل ضم التقنيتين معا، أي التحور الوراثي وتجديد انماء النبات لاستخدامها في نباتات ذوات الفلقـــة الواحـــدة التـــي لهـــا اهميتها زراعيا. وحدثت اوجه تقدم في استخدام بكتريا الاجروباكتيريام لتعديل الذرة وراثيا وفي تجديد نبات الارز باستزراع بروتوبلاست الارز، وفـــي احـــداث تعديـــل في الذرة بالتثقيب الكهربي (كانت النباتات الناتجة عقيمة). فى عام ١٩٨٩ تم تجديد انماء نبات الذرة من البروتوبلاستات (ولكن هذا التكنيك لم يفلح). فى عام ١٩٩٠ كانـــت ثمة اعلان عن ذرة خصبة تم تعديلها وراثيا بادخال جزيئيات مغلفة من الـــ Bt δ-exotoxin DNA باستخدام "مسدس جين" gene gun لاطلاق طلقات معدنية دقيقة الصغر مغلفة بالجينات المناسبة تطلق مباشرة لداخل الخلية.

بعد ذلك امكن لشركات البيوتكنولوجي انتاج اصناف من الذرة بها جينات بكتيريا ال B.t. المســئولة عـــن افراز التوكسينات السامة. لقد استخدمت هذه الشركات بعض النواقل مـــثل فـــيروس موزايـــك القرنبـــيط، حـــبوب اللقاح او مادة phosphoenolpyruvate carboxylase PEGC) لنقل هذه الجينات الي نباتات الذرة.

لقـــد اثبتت التجارب ان اصناف الذرة المحتوية على الـــBt toxin genes مقاومة للافـــات الحشـــرية التي تهاجم نباتات الذرة مثل حفار ساق الذرة الاوروبي، دودة الحرب، حفـــار الـــذرة، ودودة كيزان الذرة كما وجد ان تغذية يرقات دودة كيزان الذرة على اغلفة الكيزان والشعيرات الحريرية للكوز تؤثر على نموها كما تؤدي الي موت نسبة عالية منها.

يمكن القول ان اصناف ال Bt-corn تخفض من نسبة اصابة الذرة ببعض الحشرات التـــي تهاجمـــه وتقلـــل الضـــرر الي مستويات منخفضة كما تقلل اصابة الكيزان واعداد اليرقات/كوز بدودة كيزان الذرة وترفع بالتالى من انتاجية الذرة.

كمـــا اثبتت الابحاث ان حبوب الذرة المحور وراثيا احتوت على كميات من الـــ Bt Cry proteins اثـــرت علـــى تعداد حشرات المواد المخزونة التي تهاجم هذه الحبوب في

المخــزن مــثل دودة جريش الذرة وفراش الحبوب. كما اجريت دراسات معملية حديثة (٢٠٠١) شــملت تاثير حبوب الذرة المحتوية علي توكسينات البكتيريا على فترات النمو ، الكفــاءة التناســلية وتعداد هذه الحشرات. وقد اوضحت النتائج ان هذه الحبوب الناتجة من نــباتات ذرة محــورة وراثيا ادت الي اطالة فترات نمو الحشرتين وخفضت من كفاءتهما التناسلية كما ادت الي تقليل تعدادهما.

مقاومة الحشرات الضارة للنباتات المحورة وراثيا (Bt plants).

ان النــباتات المهندسة وراثيا (Bt plants) والقادرة على انتاج الاندوتوكسينات فى انســجتها. اصــبحت تنــتج تجاريا خلال العقدين الاخيرين. هذه النباتات نجحت فى تقليل الاعــتماد علــي المبيدات السامة في مكافحة الحشرات، الا ان هذا النجاح سوف لا يستمر طويــلا اذا ظهرت سلالات مقاومة للــBt toxins او اذا احتجنا لاستخدام المبيدات السامة في مكافحة بعض الحشرات الاخرى على نفس النباتات المحورة وراثيا والتي لا تتاثر بال Bt toxins. لذلــك يجــب ان تكون هناك دراسات ايكولوجية تلعب دورا حيويا في وضع اســتراتيجيات لــتفادي المشــاكل التي سوف تنجم عن زراعة هذه النباتات المحتوية علي جينات ال Bt toxins. على سبيل المثال تحديد العوامل البيئية التي تؤثر فى معدل سرعة ظهور السلالات المقاومة ، دراسة التفاعل بين النبات والحشرة .. الخ.

لقد اوضحت الدراسات الحديثة ان المقاومة المبنية على اساس وراثي في الحشرات لــل Bt toxins تشــابه مقاومة الحشرات للمبيدات الكيميائية. فى هذا المجال اشار بعض الباحثيــن الي ظهور جينات مقاومة لل Bt toxins فى حشرة دودة براعم التبغ، والفراشة ذات الظهــر الماسي. كانت احد الافكار التي طرحت لتقليل ظهور سلالات مقاومة لل Bt toxins هــو اتــباع استراتيجية ادخال اكثر من جين (كل جين مسئول عن افراز توكسين معيــن مــثل CryI(A), BIC , CryII toxins .. الــخ) اما دوريا او تتابعيا او كخليط لتجنب سرعة ظهور سلالات مقاومة. لكن تواجد صفة عبور المقاومة للتوكسينات المختلفة وقدرة الحشرات على ان تصبح مقاومة لاكثر من توكسين سوف تكون من العوامل المحددة لنجاح استخدام هذه النباتات في الزراعة مستقبلا.

مــن الحشرات التي اظهرت مقاومة لل Bt toxins هي دودة اللوز القرنفلية (ولكن كانــت الحشرات المرباة علي قطن محور وراثيا تتزاوج مع الحشرات المرباة على القطن العــادي). كذلك اظهرت حشرة حفار ساق الذرة الاوروبي مقاومة للذرة المهندس وراثيا (

(Bt-corn) وايضـــا دودة جريش الذرة الهندي اظهرت مقاومة بعد تغذيتها على حبوب ذرة معامل بال Bt.

لقـــد استخدمت بكتريا الباسيلليس ثورينجينسيز Bt كمبيد حيوى منذ أكثر من حقبتين زمنيتين وكان يفترض أن تطور وتكوين السلالات المقاومة من الحشرات للبكتريا أقل بناء علـــى الـــتقارير الواردة من الكشف عن مقاومة مجاميع الآفات فى الحقول المفتوحة (de barjac وآخـــرون ، ١٩٨٧). بالرغم من المقاومة لبكتريا Bt سجلت فى المجاميع الحقلية للفراشة ذات الظهر الماسى (Tabashnik وآخرون، ١٩٩٠). هذه التقارير وغيرها أكدت علـــى إمكانية تكوي المقاومة من جراء الانتخاب في المعمل للوصول الى المقاومة لبكتريا Bt بواســـطة العديد من الآفات (Mc Gaughey، ١٩٨٥). لقد تم الاستعراض المرجعى لمخـــتلف نواحـــى مقاومـــة الحشرات لبكتريا Bt مثل الانتخاب فى المعمل، تقييم مخاطر المقاومـــة، التبايـــنات بيـــن المجاميع الحشرية المختلفة، تقنيات عبور المقاومة، الوراثية، الثبات، اللياقة وتكاليف وإدارة كل هذه النواحى (Ferre وآخرون، ١٩٩٥). فى هذا المقام سوف نتناول بعض تقنيات المقاومة واستراتيجيات السيطرة وإدارة عملية التطور.

الضـــغط الانتخابى المكثف لمجاميع الحشرات أدت الى تطور فظيع للمقاومة. يمكن أن تـــتحقق المقاومـــة بتقنـــيات مخـــتلفة تتراوح من نقطة هضم السم الأولى Protoxin digestion الـــى إدخـــال التوكسين فى الغشاء. العوامل التى تؤثر على ارتباط التوكسين للمستقبل قد تؤدى الى مقاومة اختيارية. من جهة أخرى فان المقاومة الناتجة من التغييرات عـــند الخطوات الشائعة مع كل التوكسينات مثل التحلل البروتينى للسموم الأولية والتغيرات التوجيهـــية واختراق الغشاء سوف تؤدى الى مقاومة مشتركة للأقسام المختلفة لتوكسينات البكتريا Bt. الدراسات التى أوضحت أن رقم حموضة المعى الأوسط وطبيعة البروتيزيس يحـــتمل أن تشـــترك فـــى إحـــداث المقاومة (Oppert وآخرون، ١٩٩٤). لقد تم خفض الارتـــباط لتوكســـين Bt للغشـــاء الخارجى للطبقة الطلائية للمعى الأوسط وتعريفه كتقنية لحـــدوث المقاومـــة لحشرة اليلوديا انتربنكتلا (Van Rie وآخرون، ١٩٩٠). والبلوتيللا زايلوســـتيلا (Ferre وآخـــرون، ١٩٩١، Bravo وآخـــرون، ١٩٩٢ أ ، ب). أوضحت الدراســـات الـــتى استخدم فيها الكراى Ab 1 المعلم إشعاعيا حدوث خفض ١٠٠ مرة فى الســـمية فـــى النســـبة بين السلالة المقاومة والحساسية للبلوديا أنتربنكتيلا. أظهرت سلالة D.xylostella مـــن الفلبيـــن حدوث ٢٠٠ مرة فى المقاومة للكراى 1Ab ولم يحدث أو

حــدث بشــكل قلــيل ارتــباط التوكسين للغشاء الطلائى للمعى الأوسط بالمقارنة بالسلالة الحساسة.

على عكس النتائج التى تحصل عليها من بلوديا انتربنكتللا وحشرة بلوديا زيلوستيللا وفــى تجارب مستقلة على دودة اللوز الشوكية وجد عدم وضوح فى الارتباط بين ارتباط التوكســين والمقاومــة للكــراى 1Ab أو الكــراى 1Ac (Gouldl وآخــرون، ١٩٩٤، McIntosh وآخــرون، ١٩٩١). الدليل الوحيد ضد اشراك خطوة الارتباط فى تقنية كلا المقاومــة والتخصصــية تــم توصيفه (Wolfersberger، ١٩٩٠). لقد وجد الباحث أن Lymantria dispar وجود ارتباط سالب بين القابلية للارتباط والسمية فى نوعين مختلفين مــن توكســينات Bt تجاه سلالة فردية من الحشرة. لذلك اتفق على أنه كلما زادت ارتباط البروتيــن السام كثيرا قلت القابلية عما هو الحال مع البروتينات الأقل سمية. أظهرت نتائج Wolfersberger توافقــه مــع الفكــرة بوجود اختلافات فى السمية وكذلك اختلافات فى القدرة على الارتباط.

مــن الملاحظــات الهامــة ذات المعــنوية تطور المقاومة فى البلوديا انتربنكتيللا للتوكســينات المــتعددة (McGaughey and Johnson ، ١٩٩٢). التكرارية الملحوظة لحــدوث المستعمرات المقاومة من الحشرة يبدو أنها كانت عالية جدا لنوعين من الطفرات المســتقلة كل منها تغير مستقبل متخصص لكى يحدث توافقيا فى الحشرة. من الممكن ان المقاومة التى ترجع الى طفرة فى موقع واحد تنتج أنواع من التوكسينات غير فعالة كما هو الحــال مع دودة اللوز الأمريكية ذات المقاومة الواسعة (Gould وآخرون، ١٩٩٢). من الممكن كذلك أن هذه المستقبلات لحد ما تتداخل أو تكون كالعنقود لدرجة أن الطفرة الفردية تؤثــر علــى صــفات الارتباط للتوكسينات العديدة. لقد لوحظ حديثا أن الجين المنفرد كان مســئولا عن حدوث المقاومة فى الفراشة ذات الظهر الماسى (DBM) لأربعة بروتينات BT (Tabashnik وآخــرون، ١٩٩٧). مــن المطلوب بذل مجهودات أكبر لمعرفة كيفية إحــداث فعل التوكسين حتى يمكن فهم أساس تطور المقاومة والتعامل مع المشاكل العملية الخطيرة إذا جاء الوقت الذى تستخدم فيه بكتريا Bt بشكل مكثف.

إدارة المقاومة Resistance management

مــع عقلانــية وحقيقة أن الحشرات يمكن أن تطور المقاومة للباسيلليس Bt. تركز الجهــود الحالــية نحــو تطوير استراتيجات النشر التى قد تؤخر أو تمنع نشوءه وتطوره.

التعبـــير الخـــاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا قد تؤدى الى الانتخاب المستمر للآفـــات فـــى اتجاه المقاومة الشديدة لأن الحشرات تتعرض للبكتريا Bt حتى لو لم تسبب ضـــرر اقتصـــادى (Mallet and Porter، ١٩٩٥). لقـــد اقترحت استراتيجيات مختلفة للتغلـــب علـــى تطـــور مشكلة المقاومة وقام بتلخيصها Whalon and McGanghey، (١٩٩٣). لقد أدخلت هذه التكتيكات بعد تلك التى استخدمت أو اقترحت فى السيطرة وإدارة المقاومة للمبيدات الحشرية الكيميائية والتى تتضمن إشراك الآتى:

١- دورة وتغيرات التوكسينات .

٢- مخاليط أو تتابعات التوكسينات .

٣- توفير المأوى والملاذ .

٤- الجرعات العالية جداً من التوكسين .

٥- التعبير المؤقت والمكافىء بجينات توكسين Bt فى النباتات المتحولة وراثيا

١ - الدورات Rotations

الـــدورة أو تغيير توكسينات Bt والمبيدات واستراتيجيات المكافحة الزراعية والحـــيوية تعتـــبر من الاقترابات لإدارة المقاومة. يعتمد نجاح هذه التكتيكات على إعادة الحساسية عند وقف الضغط الانتخابى أو التغيير نحو جين آخر أو توكسين أو مبـــيد حشـــرى آخر. الدورة بين التوكسينات التى تعبر عن المقاومة المشتركة لكل مـــنها والآفرين ذات قيمة محدودة (Gould، ١٩٨٨، Gould وآخرون، ١٩٩٢). الدراســـات الـــتى توضـــح عـــدم ثبات المقاومة للباسيلليس Bt فى P.xylostella (Hama وآخرون، ١٩٩٢) وH.virescers (Sims and Stone، ١٩٩١) وحالة واحـــدة مـــن عبور المقاومة السالبة فى P.interpvnctella (Van Rie وآخرون، ١٩٩٠) أدت الـــى الاقـــتراح بان الدورات قد تبطىء من تطور المقاومة فى بعض المواقف. لقد وجد McGavghey and Beemam، (١٩٨٨) أن المستويات العالية مـــن المقاومـــة فى P.interp كانت ثابتة لفترات طويلة وفى بعض الحالات قد لا تكون الدورات فعالة.

٢- مخلوط التوكسينات

إن مخلوط التوكسينات يعتبر من التكتيكات البسيطة نسبيا الذى يمكن استخدامه فـى التطبـيقات التقليدية والنباتات المهندسة وراثيا. يبنى هذا الاقتراب على نظرية الاحـتمال والتى توجد إذا كانت المقاومة لكل مكون فى المخلوط نادرة ومن ثم فان الأفراد ذات المقاومة لكل المكونات سوف تكون نادرة أو غائبة. لذلك فان المقاومة المشتركة الشديدة والمكثفة بين توكسينات Bt المختلفة قد تؤدى الى خفض المردود بأن المخلوط سوف يتغلب بشكل فعال على المقاومة (Gould وآخرون، ١٩٩٢). العديـد مـن المجامـيع الحقلية لحشرة P.xylostellaa سرعان ما تصبح مقاومة لمخلـوط فى سلالتان Bt التى تحتوى على الأقل ستة توكسينات كراى 1A، كراى Cry II , Ic. مطلوب مزيد من البحوث للكشف عن نظام استجابة الأنواع المختلفة من الحشرات لمخاليط Bt قبل وضع التوصيات المناسبة مما يؤكد منع المقاومة.

٣- المأوى Refuges

توفير ظروف معيشة وبقاء الحشرات الحساسة واحد من أفضل الاقترابات فى خفـض تطـور المقاومـة. أظهرت النتائج من دراسات النماذج أن المأوى وهجرة الحشـرات الحساسة فى مجاميع الآفة يمكن أن تبطىء من نشوء المقاومة. لقد تأكد وعضد هذا الموقف من نتائج الدراسات المعملية على دودة اللوز الأمريكية وحشرة P.xylostelh. النشـر المكانى والمؤقت لإمكانيات المأوى تسهل التزاوج العشوائى بيـن الحشرات البالغة الحساسة والمقاومة وقد تحد من حركة اليرقات بين النباتات المعاملـة ببكـتريا Bt وغـير المعاملة (Mallet and Porter، ١٩٩٢). المأوى المكـانى يمكـن أن يـزود بيـن الأنسجة داخل النباتات بتأكيد التعبير المتخصص النسـيجى لجيـنات Bt وكذلـك بين النباتات داخل الحقل بواسطة زراعة النباتات المهندسـة وغير المهندسة وراثيا بنسبة معروفة أو بين الحقول والتى تجاور حقول مـزروعة بأصناف نباتية تختلف فى حساسيتها لحشرة معينة. لقد أشار Denhdm and Rowland، (١٩٩٢) إلـى استراتيجية الجرعة العالية مع أماكن معيشة غير معاملـة كوسـائل فعالة فى إدارة تطور المقاومة فى النباتات المتحولة وراثيا. هذا الاقـتراب يشير الى أنه يقوم بتعديل التعبير المستمر والتركيبى لتوكسينات Bt فى النباتات المتحولة وراثيا وهو يستطيع أن يقتل كل الزيجوتات غير المتجانسة بشكل

كـــافى فى المجموع. هذا الاقتراب غير ممكن مع التطبيق التقليدى لبكتريا Bt لأن الـــرش على المجموع الخضرى لا يمكن أن يغطى النبات جيداً وبتجانس ومن ثم لا يثبت لفترة كافية لتحقيق التعبير المستمر للبكتريا Bt.

٤- الجرعة فائقة أو متناهية الكبر **Ultra high dose**

يمكـــن اســـتخدام جـــرعة متناهية فى الكبر عندما تكون الحشرات المستهدفة حساسة جداً والتعبير الخاص ببكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثيا عالية جدا (١ % مـــن البروتيـــن الكلـــى). مـــن الممكن تطوير هذه النباتات بتعبير الجينات فى الكلوروبلاســـت (McBride وآخرون، ١٩٩٥). هذه الجرعة عالية بما فيه الكفاية كـــى تقـــتل حتى الأفراد المقاومة متجانسة الزيجوتات. هناك شك مستمر بسبب أن الجـــرعة الأعلى حتى ٢٦٨ جم/لتر من مستحضر Bt لا تقتل الأفراد المقاومة من P.xylostella. كمـــا ذكـــر سابقا فان القابلية للارتباط فى التوكسينات تعتبر التقنية الأولـــية للمقاومة فى P.xylostella. إذا كانت اقترابات القدرة على الارتباط صفر فـــان محاولات قتل الحشرات المقاومة باستخدام الجرعة العالية قد تكون غير ذات جدوى (Tabashnik، ١٩٩٤).

٥- التعبير الجينى المتحكم فيه **Controlled gene expression**

التعبـــير المكانى والمؤقت والمحفز لجينات بكتريا Bt فى النباتات المهندسة وراثـــيا تعتبر واحدة من ملامح استراتيجيات الإدارة ضد الآفات. التعبير التركيبى والمســـتمر لجيـــنات بكتريا Bt أدت الى ضغط انتخابى معنوى على مجاميع الآفة. التخصص النسيجى (أوراق – سوق – جذور – لوز – براعم – بذور) والتخصص الطـــورى (خضـــرى – تكاثرى) وبادئات ومحفزات الجروح الخاصة أصبحت فى المتـــناول الآن والـــتى يمكن أن تستخدم لعقلانية وتدوير التعبير الجينى لبكتريا Bt باســـتخدامها نفسها (Williams وآخرون، ١٩٩٢). كل هذه الاقترابات تحتاج الى التأكـــيد تجريبيا بنظام متجانس. لسوء الحظ فان أى من النباتات المهندسة وراثيا لم تتعرض للتحدى التجريبى للحشرات المقاومة لبكتريا Bt. مازلنا فى حاجة الى مزيد مـــن البحوث والدراسات لتقييم دور سلوك الحشرة وغيرها من العوامل البيولوجية

والايكولوجية والوراثية في تطور المقاومة في الحشرات لبكتريا Bt والنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt.

التأثيرات الجانبية للنباتات المحورة وراثيا (Bt-plants) على الأعداء الحيوية

من المعروف ان الطفيل الحشري يحتاج الي عائل واحد فقط ليكمل عليه دورة حياته .. بينما يحتاج المفترس الي العديد من الفرائس (الضحايا) ليكمل دورة حياته.

تعتبر النباتات المهندسة وراثيا والمحتوية على جينات مسئولة عن إنتاج التوكسينات السامة (Bt Cry genes) لهـا فوائد زراعية كثيرة .. ولكن هذه التكنولوجيا الجديدة لها تاثيرات مباشرة وغير مباشرة على سلوك الأعداء الحيوية سواء على المستوى الفردي او المجموع.

تأثير النباتات (Bt-plants) على سلوك وفسيولوجيا المتطفلات الحشرية:

التاثير على يرقات الطفيل:

ان النباتات المحتوية على جينات ال ICPs والمقاومة للحشرات الضارة تؤثر على المتطفلات الحشرية بطريقة مباشرة وغير مباشرة – بمعنى ان هذه النباتات اما ان تؤثر على مناسبة العائل الحشري الذي يتطفل عليه الطفيل (تاثير غير مباشر) او ان الطفيل يتغذي مباشرة على البروتينات السامة اثناء تغذيته على انسجة العائل الحشري (تاثير مباشر).

لقد ذكر بعض الباحثين ان يرقات المتطفلات الحشرية التي تتطفل على عوائل نباتية بكتيرية عالية المقاومة لا تستطيع ان تكمل دورة حياتها نتيجة لموت العائل الحشري. ايضا النباتات التي تحتوي على مستويات منخفضة من التوكسينات السامة تعيق نمو الافة الحشرية وتقلل من استهلاكها للغذاء النباتي فيقل وزنها وبالتالي تؤثر علي المتطفلات الحشرية. فعلي سبيل المثال .. فان معاملة يرقات الفراشة ذات الظهر الماسي بجرعات تحت مميتة من المبيد البكتيري اعاقت عملية تعذر احد الطفيليات التابعة لعائلة Fam. Braconidae ، ولكن نفس هذه اليرقات المعاملة لم تؤثر على طفيل اخر تابع لنفس العائل حيث ان نسبة تعذر يرقات هذا الطفيل لم تختلف عن يرقات العائل المعاملة بكتيريا Bt عن الغير معاملة. في بعض طفيليات عائلة Tachinidae لم يتاثر نمو يرقات داخل يرقات خنفساء كلورادو والمعاملة بجرعات تحت مميتة من ال Bt – ولكن تاثر فقط خروج الحشرات الكاملة للطفيل (قلت نسبة الخروج).

أي يمكن القول ان الانخفاض في جودة العائل الحشري (نتيجة تغذيته على الـ Bt plants) يمكن ان تؤدي الى خفض في نسبة بقائية يرقات طفيلياته، نسبة خروج الحشرات الكاملة للطفيل، حجم الحشرات الكاملة والكفاءة التناسلية لهذه الطفيليات.

التأثيرات المباشرة للنباتاتBt على الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية.

مـن المعروف ان الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية تعيش حرة وتحصل علي احتـياجاتها الغذائية علي رحيق الازهار او الندوة العسلية او دم العائل. من الجدير بالذكر فـان التوكسينات التي تنتج داخل نباتات الـ Bt ممكن ان تنتقل الي حبوب اللقاح، رحيق الازهـار والـندوة العسـلية. لكـن هذه التوكسينات السامة (Bt toxin proteins) تكون متخصصة ضد حشرات حرشفية وغمدية الاجنحة وغير سامة للحشرات الكاملة للطفيليات. فعلـي سـبيل المـثال وجد ان الحشرات الكاملة للطفيل Nasonia vitripennis لم تتاثر عندماغذيـت علـي محلول من عسل النحل يحتوي على الـ CryIAc توكسين – كما ان التغيـير فـي محـتوي دم العائل نتيجة تغذيته علي النباتات المهندسة وراثيا قد يؤثر علي المتطفلات الحشرية ولكن هذه الملاحظة لم يتطرق اليها احد من الباحثين.

يجـب ان نشير هنا ايضا الي انه من اجل ان تتكاثر اناث المتطفلات الحشرية فانها تبحـث عـن العوائل الحشرية المناسبة. حتى تستطيع هذه الاناث ان تجد عوائلها المناسبة وتنجح عملية التطفل فانها تمر بعدة مراحل هي: البحث عن البيئة المناسبة – الوصول الي العـائل – قبول العائل للطفيل – مناسبة العائل لنمو الاطوار الغير كاملة للطفيل .. وعملية عثور اناث الطفيليات علي عوائلها تكون من خلال احدي هذه الوسائل .. بحث عشوائي – الـرائحة التـي يصدرها النبات او العائل الحشري – الحس البصـري – التلامس .. الخ – وبالتالـي فـان وضـع جينات جديدة وغريبة داخل النباتات ممكن ان تؤدي الي تغيير في صـورة (تركيب) الزيوت الطيارة التي تفرزها هذه النباتات وتجذب الطفيليات. نظرا لان دخـول جيـن جديد الي النبات يؤدي الي حدوث تغير جيني للنباتات هذا التغير يؤدي الي حـدوث تغـير فـي التركيب الكيميائي للروائح التي تطلقها هذه النباتات ونتيجة لذلك فان المـتطفلات الحشرية قد لا تستطيع العثور علي عوائلها المناسبة. مثال ذلك .. فان بعض الباحثيـن ذكروا ان الكرنب المهندس وراثيا ادي الى خفض نسبة التطفل علي من الكرنب بطفـيل Diaeretiella rapae لان هذا الكرنب انتج كميات قليلة من مادة الجليكوسينولات وهـي المـادة التي يعتمد عليها الكرنب في تكوين الروائح التي يطلقها لجذب هذا الطفيل ولكن الكرنب العادي ينتج كميات عالية من هذه المادة.

التأثيرات الغير مباشرة للنباتات Bt علي الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية.

ان تغذيـــة الآفـــات الحشرية الضارة علي النباتات تحدث تغيرات في درجة انبعاث روائـــح كيميائيات التواصل التي تصدرها هذه النباتات (Synomones) مما يجعل النبات اكـــثر جذبـــا لانـــاث الطفيليات. حيث لاحظ كثير من الباحثين ان اناث بعض المتطفلات الحشـــرية تـــنجذب نحو النباتات التي تتغذي علي يرقات سليمة (صحية) اكثر من النباتات التـــي تتغذي عليها يرقات معاملة بجرعات تحت مميتة من مبيدات الـــ Bt. لقد وجد احد الباحثيـــن ان نســـبة التطفل علي يرقات دودة براعم التبغ باحد الطفيليات قد انخفضت علي نـــباتات التبغ المهندسة وراثيا بجينات الـــ Bt toxins عن النباتات العادية .. ويرجع ذلك الـــي ان انخفاض درجة تغذية اليرقات علي نباتات الـــ Bt ادى الي انخفاض جذب النبات للطفيل.

ايضا يلعب براز العائل الحشري دورا مهما في إيجاد انثي الطفيل لعائلها المناسب. حدوث أي تغير في رائحة الكيرومونات التي يصدرها العائل الحشري تؤثر في نجاح انثي الطفـــيل في الوصول الي عائلها ومن الممكن ان يؤدي تناول العائل الحشري للتوكسينات من الـــ Bt plants ان يتاثر تركيب الكيرومونات.

كمـــا تلعـــب التغـــيرات السلوكية للعائل الحشري الناشئة عن تواجده علي النباتات المهندسة وراثيا دورا مهما في التاثير علي نسبة التطفل عليها (بالزيادة او النقص) – فمثلا وجـــد ان معاملـــة يرقات بعض الحشرات بمبيدات الـــ Bt قللت من قدرتها الدفاعلية ضد هجمات الطفيل وبالتالي زادت نسبة التطفل. ايضا النباتات المهندسة وراثيا والتي لها تاثير مانع للتغذية تزيد من سرعة حركة العائل الحشري مما يؤدي الي هروبه من الطفيل. ولقد وجـــد انـــه عـــند تعرض اليرقات حديثة الفقس لحشرة دودة براعم التبغ لاناث الطفيل في المعمل فان نسبة التطفل علي نباتات الـــ Bt-tobacco كانت منخفضة عن النباتات الغير محورة وراثيا وهذا يرجع الي اختلاف سلوك العائل الحشري علي النباتين.

بالاضافة الي التاثيرات السابقة .. فان النباتات المهندسة وراثيا والمقاومة للحشرات ممكن ان تؤثر علي النسبة الجنسية للمتطفلات الحشرية .. وهذا يحدث نتيجة لان الحشرات التـــي تتغذي علي هذه النباتات يقل حجمها وهذا يجعل اناث الطفيل تضع كميات اكثر من البيض الغير مخصب الذي ينتج ذكور.

التاثيرات الجانبية للنباتات Bt علي سلوك المفترسات

من المعروف ان المفترسات تعيش معيشة حرة في كلا من طوري اليرقة او الحورية والحشرة الكاملة – ولها القدرة علي الحركة وعادة لها مدي واسع من الفرائس. بعض المفترسات مثل ابي العيد تجد فرائسها عن طريق البحث العشوائي ولكن الحشرات الكاملة لاسد المن تصل الي ضحاياها مسترشدة بالروائح التي تصدرها النباتات – بينما هناك مفترسات اخرى مثل احد الاكاروسات المفترسة التابع لعائلة Fam. Phytoseiidae تجد فرائسها مسترشدة ايضا بالروائح النباتية والتي لا تصدر من النبات الا نتيجة تغذية الفرائس (افراد الافة) عليها.

اما عن تاثير نباتات الـ Bt علي المفترسات فقد اكدت بعض الدراسات ان تغذية احد مفترسات ابي العيد من الخوخ المربي علي نباتات البطاطس Bt-potatoes (المحتوية علي Bt toxin متخصص ضد حشرات غمدية الاجنحة) لم تؤثر علي نسبة استهلاك المفترس للمن او علي نموه او كفاءته التناسلية. وايضا فان تغذية احد مفترسات ابي العيد وبقة الاوريس واسد المن علي حبوب لقاح ذرة محتوية علي توكسين متخصص لحرشفية الاجنحة لم تؤثر علي هذه المفترسات.

علي العكس من ذلك فقد لاحظ بعض الباحثين انه عند تغذية يرقات اسد المن علي حفار الذرة الاوروبي المربي علي نباتات ذرة محتوية علي الجين المسئول عن افراز توكسين الـ CryIAb ادي ذلك الي زيادة نسبة موت يرقات اسد المن ، طالت مدة الطور اليرقي، بينما لم تتاثر يرقات اسد المن بتغذيتها علي دودة ورق القطن المرباه علي نفس نباتات الذرة.

أي ان هناك بعض الدراسات الحقلية اظهرت تاثير تنشيطي للنباتات المهندسة وراثيا علي الاعداء الطبيعية. بينما بعض الدراسات الاخري اكدت ان لهذه النباتات تاثير عكسي (مثبط) للاعداء البيولوجية.

تاثير النباتات Bt على ديناميكية تعداد الاعداء الطبيعية.

يرتبط مدي تاثير النباتات المهندسة وراثيا علي ديناميكية تعداد الاعداء البيولوجية بمجموعة من العوامل نسردها فيما يلي:-

(١) فيما يتعلق بالنباتات المحورة وراثيا .. مثل مستوي مقاومة النبات – ناقل الـ Bt gene الي النبات – مدي امكانية حدوث تغيير في تركيب الروائح النباتية التي

يصـــدرها النبات – وجود احتياطي من النباتات القابلة للاصابة – حجم المحصول ...

(٢) فيما يتعلق بالافة الحشرية .. مثل مدي حساسية الحشرة للتوكسين – وجود عوائل بديلـــة – التغير في سلوك الافة الحشرية التي تحدث نتيجة زراعة هذه النباتات – نوعـــية المادة الغذائية التي تتناولها الافة الحشرية – التغير في حجم الرائحة التي يصدرها النبات نتيجة تغذية الافة الحشرية عليه – حركة الافة.

(٣) فـــيما يتعلق بالعدو الحيوي .. مثل نوع العدو الحيوي (مفترس او طفيل) – المدي العوائلي او الفرائسي للطفيل او المفترس – حركة العدو الحيوي – مدي حساسية العدو الحيوي للتوكسين الذي ينتجه النبات – الكفاءة البحثية للعدو الحيوي.

في هذا الاطار اكدت بعض الدراسات ان بعض طفيليات دودة براعم التبغ لم يختلف تعـــداداه معـــنويا بيـــن نباتات الـــ Bt ونباتات التبغ العادي. كما ان نباتات التبغ المهندسة وراثـــيا لـــم تؤثر علي تعداد البق المفترس من عائلة Nabidae. كما ذكر بعض الباحثين ايضـــا ان نباتات الذرة المهندسة وراثيا Bt maize لم تؤثر علي ديناميكية تعداد مفترسات حفـــار ســـاق الـــذرة الاوروبية (ابي العيد، بقة الاوريس واسد المن) أي انه ليست هناك اخـــتلافات معنوية بين كثافة هذه المفترسات ونسبة افتراسها لبيض الافة علي نباتات الذرة المهندســـة وراثيا والنباتات العادية. كذلك اظهرت الابحاث ان نباتات الـــ Bt-cotton لم تظهر أي تاثير معنوي علي تعداد المفترسات.

مـــن الممكـــن احـــيانا ان يحـــدث انخفاض في تعداد الاعداء الطبيعية في الحقول المـــزروعة بالنـــباتات المحـــورة وراثـــيا وذلك نتيجة لتاثير هذه النباتات علي تعداد الافة الحشـــرية ولكـــن لـــيس ذلك باهمية بمكان اذا ما توافرت العوائل البديلة لهذه المفترسات والطفيليات في الحقول الزراعية.

لقـــد درس بعـــض الباحثين التاثير المشترك لاستخدام نباتات القطن (المحتوية علي جرعات تحت مميتة) من توكسين الـــ CryIAC مع الاعداء البيولوجية في مكافحة يرقات حشـــرة Helicoverpa zea ووجـــدوا انه لا يوجد اختلاف معنوي في التاثير علي تعداد يـــرقات هذه الحشرة بين النباتات المهندسة وراثيا والنباتات العادية في حالة غياب الاعداء الطبيعـــية. امـــا في وجود الاعداء الطبيعية فقد انخفض تعداد الافة الحشرية علي النباتات المهندسة وراثيا بانخفاض معنوي مقارنة بالمرباه علي نباتات القطن العادية.

امـــا عن تاثير نباتات الـــ Bt علي الاعداء البيولوجية للافات الغير مستهدفة .. فلم تـــنل أي اهتمام من قبل الباحثين ومع ذلك يمكن القول بان هذه الاعداء البيولوجية قد تتاثر

نتـيجة تـناولها بعض المنتجات النباتية (حبوب لقاح مثلا) او تتغذي علي العائل الحشري الـذي تغذي علي النبات المحتوي علي التوكسين السام. كما ان تقليل استخدام هذه النباتات المهندســة وراثـيا تـؤدي الي زيادة تعداد الافات الحشرية الثانوية ويعقب ذلك في تعداد اعداؤها البيولوجية.

اخـيرا يمكن القول انه حتي الان فان الدراسات الحقلية لم تظهر أي تاثيرات سلبية للـ Bt crops علي الحشرات النافعة. لكن اوضحت بعض الدراسات المعملية ان تاثيرات سلبية مباشرة للـ Bt toxins علي الحشرات غير المستهدفة فعلي سبيل المثال زادت نسبة مـوت يـرقات اسد المن عند تغذيتها علي غذاء صناعي يحتوي علي الـ CryIAc. كما ذكـر بعـض الباحثين ان نسل الطفيل D. rapae لم يتاثر تعداده بتغذيته علي من الخوخ المربـي علي نباتات محورة وراثيا. ولم يحدث انخفاض معنوي في عدد المومياوات ولا علي النسبة الجنسية وهذا يدل علي ان يرقات هذا الطفيل لم تتاثر بالبروتينات السامة او ان حشرات من الخوخ لم تبتلع كميات كافية من البروتين السام الذي يجعلها تؤثر علي الطفيل عندما يتغذي عليها.

تاثير التسميد علي انتاج التوكسينات السامة داخل النباتات المحورة وراثيا (Bt-plants).

مـن الطبيعي ان النباتات التي تنمو في جو يحتوي علي نسبة عالية من ثاني اكسيد الكـربون CO_2 يرتفع معدل قيامها بعملية التمثيل الضوئي. وهذا يؤدي بالطبع الي زيادة معـدل الكربون عن معدل النيتروجين داخل النبات – أي تصبح معدلات النيتروجين داخل النبات منخفضة/وحدة نسيج نباتي.

أي ان ارتفـاع نسبة CO_2 في الجو المحيط بالنبات يقلل من المحتوي النيتروجيني للنـبات وهـذا يؤثر بالطبع علي انتاجية البروتينات السامة داخل النباتات المحورة وراثيا (Bt-plants). ولـذا فان اضافة الاسمدة الازوتية لهذه النباتات سوف يبطل التاثير السلبي (نقـص عنصـر النيتروجيـن في النبات) الناجم عن ارتفاع نسبة CO_2 فى الجو المحيط بالنـباتات (درس هذا الموضوع علي الـ Bt-cotton). وبما ان النباتات المحورة وراثيا تحتاج الي النيتروجين حتي تستطيع انتاج البروتينات السامة للحشرات فمعني ذلك ان زيادة نسبة CO_2 في الجو المحيط بهذه النباتات سوف يؤثر في استراتيجية استخدام هذه النباتات كبدائل امنه لمكافحة الحشرات.

فـي هذا المجال ايضا اوضحت الابحاث السابقة ان زيادة نسبة ثاني اكسيد الكربون في الجو المحيط بالنباتات يؤدي الي زيادة نسبة الكربون وقلة نسبة النيتروجين داخل انسجة

النـــبات وهـــذا بـــدورة يجعل الحشرات الضارة بهدة المحاصيل تستهلك كميات اكثر من المحصـــول الخضري لهذه النباتات حتي تحصل علي احتياجاتها البروتينية. كما ذكر احد الباحثيـــن ان زيـــادة وزن الحشرة يتناسب طرديا مع تركيز عنصر الازوت داخل النبات، بيـــنما كمية الغذاء الخضري المستهلك بواسطة الحشرة يتناسب عكسيا مع تركيز الازوت داخل النبات.

نستخلص مما سبق ان وجود معدلات عالية من CO_2 في الجو المحيط بالمحاصيل المحـــورة وراثـــيا سوف يؤدي الي هذه النباتات وانخفاض المحتوي الازوتي/وحدة نسيج داخـــل النبات مما يترتب علية قلة انتاج هذه النباتات للبروتينات السامة فيقل تاثيرها علي تعداد الحشرات التي تهاجمها.

مدي الامان في التوسع في زراعة الـــ Bt-plants :

يعتـــبر انـــتاج النـــباتات المحورة وراثيا والتي تنتج البروتينات السامة (Bt plants) من افضل الطرق البديلة لمكافحة الحشرات واكثرها امانا للبيئة المحيطة. وحاليا فان هذه المحاصيل المحورة وراثيا مثل القطن، الذرة، والبطاطس تزرع علي نطـــاق واسع في بعض دول العالم المتقدم وهذه المحاصيل اظهرت كفاءة عالية في مكافحـــة بعض الافات الحشرية التي تهاجمها مثل حفار ساق الذرة الاوروبي، دودة بـــراعم التبغ، دودة اللوز القرنفلية، وخنفساء كلورادو .. الخ ، كما انها خفضت من كمـــيات المبـــيدات الكيماوية التي كانت تستخدم في مكافحة هذه الافات، كما زادت انتاجـــية هـــذه المحاصيل. هذا بالاضافة الي بعض المنافع الاخري لهذه المحاصيل والتي تتمثل في السماح للاعداء النافعة بان تلعب دورا مهما جنبا الي جنب مع هذه النـــباتات فـــي استكمال مكافحة الحشرات النافعة لم يتاثر تعدادها نظرا لانخفاض مستوي المبيدات الكيماوية المستخدمة في المكافحة.

مـــن الجديـــر بالذكـــر ان زراعـــة القطن المهندس وراثيا في امريكا وفر للمزارعين عام ١٩٩٨ ما يقرب من ٩٢ مليون دولار.

كمـــا اثبتـــت العديد من الاختبارات ان منتجات هذه النباتات امنه للانسان والحيوان والبيئة. كما ان دراسات السمية (سواء الحادة او المزمنة) والتي استمرت لاكثر من ٤٠ سنة اظهرت ان المبيدات الميكروبية بما تحتوية من بروتينات سامة (Cry toxin proteins) امـــنه للثدييات. كما اكدت الدراسات الحديثة ان البروتينات

السامة التي تنتجها النباتات المحورة وراثيا غير سامة للانسان ولا تسبب له امراض حساسية.

مستقبل نباتات Bt:

ان الاتجـــاه نحو زراعة المحاصيل المحورة وراثيا والمحتوية علي الـــ Bt genes علي نطاق واسع كاحد البدائل الامنة في مكافحة الافات. تعتبر فرصة فريدة مـــن نوعها .. للحصول علي منتجات صديقة للبيئة ، حماية البيئة من الاثار السيئة للمبيدات الكيماوية وزيادة العائد الاقتصادي للمحاصيل الزراعية. ولكن ظهور صفة المقاومـــة لبعض الحشرات ضد هذه النباتات المحورة وراثيا يعتبر العائق الاساسي في هذا المضمار بما سوف يكون له من اثار سلبية ... ولذلك فان النجاح او الفشل نحـــو التوسع في زراعة هذه المحاصيل يعتمد في المقام الاول علي توجيه الابحاث لدراســـة ظاهـــرة المقاومة وكيفية التغلب عليها .. وبالفعل بدأت الشركات المنتجة لـــبذور هـــذه المحاصيل بمساعدة الباحثين واشراك المزارعين في جمع المعلومات اللازمـــة عن هذه المحاصيل وتوفر الاموال اللازمة برسم استراتيجية لكيفية التغلب علي صفة المقاومة في الحشرات ضد هذه المحاصيل المهندسة وراثيا.

REFERENCES

Dang, M.J., Brody, M.S., Cordineau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.K. Jones A., Oakes, J.V. and McBride, K.E. (1993). The construction and expression of a Bacillus thuringiensis cryIII A gene in protoplasts and potato plants. Plant Mol. Biol. 21: 1131-1145.

Berliner, E. (1915). Uber die Schlaffsuch der mehlmottenraupe. Z. Angew. Entomol. 2: 29-56.

Bravo, A., Jansen S. and Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical localisation of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects J. Invertebr. Pathol. 60: 237-246.

Crickmore, N., Ziegler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Lambert, D., Lereclus, D., Gawron-Burke, C. and Dean, D.H. (1995). Revision of the nomenclature of Bacillus thuringiensis cry genes Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology. Bethesda, p. 14.

Dale, P.J., Irwin, J.A. and Scheffter, J.A. (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. Plant Breed. 111: 1-12.

Denholm, I. and Rowland, M.W. (1992). Tactics for managing insecticide resistance. Annu. Rev. Entomol. 37: 91-112.

Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W. and Koziel, M.G. (1996). Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nature Biotechnology 15: 137-141.

Ferre, J., Escriche, B. Bal, Y. and Van Rie, J. (1995). Biochemistry and genetics of insect resistance to Bacillus thuringiensis. FES Microbiol. Fett. 132: 1-7.

Gould, F. (1988). Genetic engineering pest management and the evolution of pests. Trends Ecol. Evol. 3: 515-518.

Hofte, H. and Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

James, W.C., Teng, P.S. and Nutter, F.W. (1991). Estimated losses of crops from plant pathogens. In: D. Pimentel, (ed). CRC Handbook of Pest Management. CRC Press, Boca Raton, Vol. 1, pp. 15-50.

Krattitger, A.F. (1997). Insect Resistance in Crops: A case study of Bacillus thuringiensis (Bt) and its transfer to developing countries ISAAA, Ithaca, NY, pp. 14-16.

Kumar, P.A., Sharma, R.P. and Malik, V.S. (1996). Insecticidal cproteins of Bacillus thuringiensis Adv. Appl. Microbiol. 42: 1-43.

McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to biological insecticide Bacillus thuringiensis. Science 229: 193-195.

McIntosh, S.C., Stone, T.B., Jokerst, R.s. and Fuchs, R.L. (1991). Binding of Bacillus thuringiensis proteins to a laboratory selected line of Heliothis virescens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8930-8933.

Nayak, P., Basu, D., Das, S., Basu, A., Ghosh, D., Ramakrishan, N.A, Ghosh, M. and Sen, S. (1997). Transgenic elite indica rice plants expressing cry1Ac δ-endotoxin gene of Bacillus thuringiensis are resistant against yellow stem borer. (Scripophaga incertulas). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2111-2116.

Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., McIntosh, S.C. and McGaughey, W.H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a Bacillus thuringiensis resistant strain of Plodia interpunctella. Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 940-947.

Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. and Fischoff, D.A. (1990). Insect resistant cotton plants. Bio/Technology 8: 939-943.

Stewart, C.N., Adang. M.J. All, J.N. Raymer, P.L. Ramachandran, S. and Parrott, W.A. (1996). Insect control and doses effects in transgenic canola containing a synthetic Bacillus thuringiensis cry1Ac gene. Plant Physiol. 112: 115-120.

Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis. Annu. Rev. Entomol. B9: 47-49.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N. and Johnson, M.W. (1990). Field development of resistance to Bacillus thuringiensis in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.,D. and Van Mallaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis. Science 247: 72-74.

Warren, G.w., Koziel, M.G., Mullins, M.A., Nye, G.J. Carr, B., Desai, N., Kostickka, K., Duck, N.B. and Estruch, J.J. 1996. Patent No. WO96/10083.

Yu, C.G., Mullins, M.A, Warren, G.W., Koziel, M.G. and Estruch, J.J. (1997). The Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1532-1536.

الفصل الثاني

أمان ومميزات النباتات المحمية ببكتريا باسيلليس ثورينجنسيز في مكافحة الآفات الحشرية

مقدمة: المنـــتجات الميكروبـــية المبنية علي الباسيلليس ثورينجنسيز (Bt) استخدمت علي نطـــاق تجاري منذ ما يقرب من ٤٠ عاما بواسطة المزارعين بما فيهم مزارعي الزراعة العضوية لمكافحة الآفات الحشرية المستهدفة (Baum واخرون ١٩٩٩). حديثا أمكن كلونة الجيـــن او الجينات التي تشفر البروتينات التي تبيد الحشرات في هذه المنتجات الميكروبية وإدخالها والتعبير عنها في النباتات المحورة وراثيا لجعل النباتات قادرة علي حماية نفسها ضد التلف الذي تحدثه الحشرات. سوف نتناول في هذا المقام القاء الضوء عن:

١- ماهية النباتات المحمية ببكتريا Bt
٢- لماذا تم تطوير النباتات التقليدية Bt
٣- مميزات استخدام المحاصيل البكتيرية Bt
٤- أمان الغذاء والأعلاف والبيئة للمنتجات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt ومنتجاتها.

هذه المعلومات سوف تساعد كثيرا في المناقشات العلمية الجارية عن مخاطر وأمان وفوائـــد هذه المنتجات علي الفلاحين والبيئة والمجتمع. قد يري البعض ان فيما استعرض تكـــرارا للأبـــواب السابقة ولكني أرد علي هذا التصور بأنه لا غضاضة حيث لكل كاتب اســـلوبة الخاص وطريقة تناول الموضوع وعندما احس بأي تكرار له سوف أحاول تفادي الوضع بأفضل طريقة.

ما هي النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt:

النباتات التي حورت لانتاج البروتين القاتل للحشرات من بكتريا Bt تعرف علي أنها نـــباتات محمـــية ببكتريا الباسيلليس Bt-protected plants. الباسيلليس بكتريا من التربة موجـــبة لجرام ذات مقدرة علي تكوين أجسام بروتينية بللورية خلال التجرثم. هذه الأجسام تتكون من بروتينات (يشار إليها بروتينات كراي Cry proteins) وهو فعال اختياريا ضد مـــدي ضيق من الحشرات ولكنة كقسم من البروتينات فعال ضد مدي عريض من الآفات الحشـــرية. بروتيـــنات الكراي تنتج كتوكسينات أولية Protoxins والتي تنشط من خلال الـــتحلل البروتينـــي بمجـــرد التـــناول. بروتينات الكراي ترتبط علي مواقع خاصة (هي

المستقبلات) في خلايا المعي الأوسط للحشرات ومن قنوات الأيونات الاختيارية في الغشاء الخلـوي. يحـدث انتفاخ في الخلايا بسبب تدفق الماء التي تؤدي الي تحلل الخلايا ومن ثم مـوت الحشرات. العديد من سلالات Bt التي تحتوي علي مخاليط حتى ٦ أو ٨ بروتينات كـراي مختلفة استخدمت علي نطاق واسع كمبيدات ميكروبية منذ عام ١٩٦١. الآن تمثل هـذه المنـتجات مـا يقرب من ١-٢% من السوق العالمي للمبيدات الحشرية. المنتجات الميكروبـية بالباسيلليس Bt كانت ومازالت من افضل خيارات مكافحة الحشرات الزراعية العضوية. الجينات التي تشفر الكراي بروتين تعتبر من الخيارات الواضحة للتعبير النباتي كوسـيلة لحمايـة النباتات ضد الآفات الحشرية. في عام ١٩٨١ تم كلونة أول كراي جين والتعبـير عـنه فـي بكـتريا الشيرشيا كولاي وبعدها بسنوات قليلة ثم أول إنتاج للنباتات المحورة وراثيا ببكتريا Bt من الطماطم والدخان والقطن.

الآن تسـوق النـباتات البكتـيرية من البطاطس والقطن والذرة تجاريا في الولايات المـتحدة الأمريكـية وواحـد او اكـثر منها تسوق في الأرجنتين وكندا والصين وفرنسا والمكسيك والبرتغال ورومانيا وجنوب أفريقيا وأسبانيا وأوكرانيا (James ٩٨ ، ١٩٩٩). هـذه النـباتات تعبر عن واحد من الكراى بروتينات المتعددة لمكافحة الآفات الحشرية من رتـب حرشـفية وغمدية الأجنحة (جدول ٨-٣). العديد من المحاصيل البكتيرية الأخرى مازالـت تحت التطوير. مع اكثر من ١٠٠ كراي جين وصفت ودستات عديدة من النباتات المتحولة لانتاج بروتينات الكراي توجد في الافق احتمالات مبشرة كبيرة لتوسيع دور وقاية النـباتات مـن خلال النباتات الميكروبية الباسيلليس Bt. الجيل الثاني من النباتات المحمية بالباسـيلليس تحـتوي جيـنات كراي متعددة ومن ثم تزود المزارعين بمنتج واسع النشاط والفاعلية في مكافحة الآفات كما تقلل من احتمالات تطور سلالات مقاومة.

جـدول (٨-٣): المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس التي تمت الموافقة عليها بشكل كامل في الولايات المتحدة الأمريكية

المحصول	الكراي بروتين	الآفات المستهدف مكافحتها	تاريخ التقديم الأول
البطاطس	Cry 3A	خنفساء كلورادو البطاطس	١٩٩٥
القطن	Cry IAC	دودة بـراعم الدخان ، ديدان لوز القطن (القرنفلية)	
الذرة	Cry Iab	ثاقـبة الذرة الأوربية ، دودة كيزان الذرة	١٩٩٦
الذرة	Cry IAC	ثاقـبة الذرة الأوربية ، ثاقبة الذرة الجنوبية الغربية	١٩٩٧

لماذا نطور النباتات المحمية ببكتريا الباسيلليس Bt

النـــباتات المحمــية بالبكتريا Bt تواكب المعيار الفاتح لتطوير أي منتج في مكافحـــة الآفـــات ونخص بالذكر منها: الرؤيا الفنية، الحاجة، الفاعلية والأمان. هذه النـــباتات المحـــورة وراثيا تقدم الأمل في الحصول علي مكافحة فعالة للآفات تتسم بالأمان. بناء علي قاعدة المعلومات المكثفة عن أتلامان واسترشادا بأربعين سنة من الاســتخدام الآمـــن للمنـــتجات الميكروبية Bt اعتبرت هذه المنتجات كمبيدات قليلة المخاطر ومن ثم كان لها حالة خاصة في اتجاه أتلامان من قبل الوكالات التشريعية. هـــذه العوامـــل دمجا مع الحاجة الشديدة لطرق مكافحة آفات افضل وما يعود علي البيـــئة من فوائد تقليل الاعتماد علي المبيدات الكيميائية بسبب الاعتماد علي النباتات المهندسة وراثيا وهي تمثل الاختيار الأفضل للمركبات الجديدة.

الجدوى التقنية Technical Feasibility:

حـــتى وقت قريب لم تكن الوسائل التقنية لانتاج النباتات البكتيرية متاحة او ميسرة. الآن أدى توفـــر ودمـــج التقنـــيات الخاصة بزراعة الخلايا والطرق الجزيئية الحديثة الي الســـماح بتـــنوع واســـع وعريض للصفات بما فيها جينات Bt والتي يمكن إدخالها بكفاءة ونشـــرها في النباتات لتحقيق مكافحة الآفات. حيث أنها بروتينات ومع التغلب علي مشكلة التعبـــير مع هذا القسم من البروتينات في النباتات اصبح في الإمكان إنتاج بروتينات بكتريا Bt بشكل مباشر ومدروس. لقد تم تعريف الاف من سلالات بكتريا Bt علي مستوي العالم والتي تزودنا بتنوع غير مسبوق وهائل للجينات والبروتينات الفعالة. خلاصة القول ان هذه الســـلالات تقـــدم مصـــدر غني جدا من جينات الكراي مما يعطي حجر الأساس لتطوير منتجات عديدة لمكافحة مجال واسع من الآفات الحشرية.

الحاجة Needs:

يـــنفق المـــزارعون بلايين الدولارات بسبب الفقد المحصولي او خفض الإنتاج من جراء الإصابة بالآفات التي يمكن مكافحتها بواسطة بروتينات كراي. في حالات مثل ثاقبة الـــذرة الأوربـــية فـــان التلف الذي يحدث للنباتات بواسطة الجيل الثاني من الثاقبات والتي دخلـــت السيقان ومن ثم يصعب مكافحتها بالمبيدات التقليدية بالرش الخارجي بالإضافة الي ذلـــك تستخدم مبيدات حشرية كيميائية هامة مثل البيرثريودات المخلقة علي القطن لمكافحة دودة الـــبراعم وقـــد فقدت هذه المبيدات فعاليتها بسبب تطور ظاهرة مقاومة الآفة لفعلها (

Smith ١٩٩٩). لذلــك فــان هناك حاجة لوسائل مكافحة الآفات مقبولة من قبل الزراع تكون مخاطرها اقل كما تكون مقبولة بيئيا من حيث العلاقة بين التكلفة والفاعلية.

الفاعلية Efficiency:

لقــد تأكدت الفاعلية المبنية علي بروتين الكراي للمنتجات الميكروبية الباسيللية Bt. لقــد تم التسويق التجاري لسلالة Bt كورستاكي HD-1 عام ١٩٦١. لقد كانت هذه السلالة لفــترة طويلة قياسية من حيث الصناعة وقد استخدمت علي نطاق واسع لمكافحة العديد من آفــات رتــبة حرشفية الأجنحة. فاعلية سلالة Bt HD1 تنتج بشكل كبير من وجود أربعة بروتيــنات كــراي : Cry 1Aa ، Cry 1Ab ، Cry 1Ac ، Cry 2Aa. جينات الكراي 1Ab ، 1Ac فــي ســلالة Bt HD1 تمثل الطرز الأولية Prototypes للجينات الجاري التعبير عنها في الذرة والقطن. تضاعف deployment بروتينات الكراي في النباتات تقدم فرصــا عديــدة لتحســين الفاعلــية بالمقارنة بالنظم الميكروبية. علي خلاف منتجات Bt الباسيللس الميكروبية فان فاعلية وكفاءة النباتات المنتجة لبروتينات الكراي لا تتأثر بتوقيت التطبــيق ودقــته ولا خوف من الغسيل بماء الأمطار وفقد الفاعلية بسبب التعرض لضوء الشــمس. النباتات البكتيرية الباسيللس تنتج كميات كافية من بروتين الكراي تأكيدا لدورها فــي مكافحة الحشرات. هذه الإسهامات وتوفير التكاليف التي تقدمها هذه المنتجات ساهمت لحــد كبــير فــي سرعة قبول والتوسع في استخدام هذه النباتات المحمية بالبكتريا من قبل المزارعين.

الأمان Safety:

العديد من الصفات المرتبطة كالوراثة بالنباتات المحمية ببكتريا الباسيللس Bt تعطي هــذه المنــتجات درجــة مــن أتلامان لا يمكن وجودها في أي من وسائل مكافحة الآفات الأخــرى. بداية فان البروتينات تقسم معروف ليس سام للأنسان والحيوانات بوجه عام كما انــه لا يتراكم حيويا في الأنسجة الدهنية ولا يكون ثابتا في البيئة كما هو الحال مع بعض المبــيدات الكيميائــية الهالوجينية. البروتينات ذات التأثيرات السامة علي الانسان والحيوان درســت جــيدا وامكــن تعريفها بسهولة في الدراسات المعملية قصيرة المدي مع الانواع المخــتلفة. الصــفة الثانية تتمثل في ان بروتينات الكراي ذات درجة عالية من التخصص لهــدف معيــن ولانــواع قريبة الارتباط من الحشرات كما يجب ان يتم تناولها في الجهاز

الهضـــمي كي تحدث الفاعلية. كل كراي بروتين يؤثر نسبيا علي انواع قليلة من الحشرات وعندما يتم تناوله فقط بواسطة الاطوار اليرقية المبكرة حيث ان اليرقات الكبيرة والمتأخرة اقــل حساســية. الصفة الثالث تتمثل في ان التعرض الانساني والغير مستهدف لبروتينات الكــراي قليل للغاية. علي خلاف المبيدات المستخدمة علي الاوراق فان بروتينات الكراي توجــد داخل النسيج النباتي بكميات صغيرة في حدود ميكروجرامات وتنتج بمستويات قليلة في حبوب اللقاح. بالاضافة الي عوامل الامان الاساسية هذه فان امان المنتج تاكد من خلال العديــد مــن قواعــد البــيانات عــن الامان من جراء الخبرات التي تحققت مع المنتجات الميكروبــية الباســيللية. علاوة علي ذلك فان امان بروتين الكراي الذي ينتج في كل نبات مهــندس ببكتريا Bt تاكد فرديا وبصفة مستقلة من خلال دراسات متخصصة عن الامان. امــان الكــراي بروتينات في المنتجات الميكروبية الباسيللس مقارنة بالامان في النباتات المحمية ببكتريا Bt سوف تناقش بالتفصيل فيما بعد. لقد تمتعت المنتجات الباسيللية بتاريخ طويل من الامان حول العالم علي امتداد ما يقرب من ٤٠ عاما.

مميزات استخدام المحاصيل المحمية ببكتريا الباسيلليس:

خـــلال خمسة سنوات فقط من التعامل التجاري سرعان ما اصبح المزارعون علي قــناعة بان النباتات الباسيللية BT تقدم وسيلة فعالة لزيادة انتاجية الزراعات المتواصلة لقد زادت المساحة المنزرعة بهذه النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس مع القطن والذرة والــبطاطس الــي ما يقرب من ١٦ مليون اكر في عام ١٩٩٨ بما يمثل ١.٧ ، ١٨% من المســاحة الكلــية للذرة والقطن علي التوالي (جدول ٨-٤). بناء علي التقارير التي نشرها James في سنوات ٩٧ ، ٨٩ ، ١٩٩٩ زادت المساحة العالمية من النباتات الباسيلليس من حوالــي ١٠ مليون اكر عام ١٩٩٧ الي ٢٠ مليون اكر عام ١٩٩٨ والي ٢٩ مليون اكر عــام ١٩٩٩. ان فوائــد خفــض تكاليف الادارة المتكاملة للافات IPM وزيادة الانتاجية المحصولية والمرونة الكبيرة في الانتاج كلها مسئولة عن التطوير السريع لهذه المحاصيل. لقــد امكــن قسم بحوث الخدمات الزراعية في وزارة الزراعة الامريكية من استخدام هذه المحاصــيل البكتــيرية الباسيللية Bt وارتبطت بالحصول علي انتاجية محصولية عالية مع قليل من معاملات المبيدات لمكافحة الافات المستهدفة.

جـدول (٨-٤): المساحة المزروعة بالمحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس في امريكا (١٩٩٨ ، ١٩٩٩)

المحصول	عدد الاكرات ١٩٩٨ (مليون)	النسبة المئوية للاكرات الكلية	عدد الاكرات ١٩٩٩ (مليون)	النسبة المئوية للاكرات الكلية
الذرة	١٤,٤	١٨	١٨	٢٢
القطن	٢,٣	١٧	٤	٢٨
البطاطس	٠,٠٥	٤	٠,٠٥	٤

المصدر: James (١٩٩٨ ، ١٩٩٩).

تناولت احدي الدراسات التي اجريت في المركز القومي للسياسة الغذائية والزراعية في امريكا التاثيرات الضارة لزراعة المحاصيل المحمية ببكتريا الباسيلليس Bt. لقد استنتج الـبحاث ان التطور السريع لهذه التكنولوجيا يرتبط بالفوائد الكبيرة التي تحققت في مكافحة الافـات وخفض التكاليف لدي الزراع. لقد اشار الباحثان جيانيسي وكاربنتر (١٩٩٩) الي ان القطـن البكتـيري اضاف عائدات ٩٢ مليون دولار في امريكا عام ١٩٩٨. لقد خلص العلماء ان الفوائد التي تتحقق من جراء استخدم النباتات الباسيللية تشمل:

أ- خفض المعاملات بالمبيدات الحشرية الكيميائية التقليدية

ب- تحقيق فاعلية كبيرة في مكافحة الافات

ت- زيادة الانتاجية المحصولية

ث- تحقـيق اضـافات لمكافحـة الافات التقليدية من خلال الحفاظ علي او زيادة اعداد مجاميع الكائنات النافعة

ج- تقليل مستويات التوكسينات الفطرية.

تقليل او خفض معاملات المبيدات الحشرية: التوسع في استخدام وتطوير النباتات المهندسة ببكـتريا Bt ادي الـي خفـض معنوي في استخدام المبيدات التقليدية. لقد ساعدت زراعة القطن البكتيري عام ١٩٩٦ مزارعي الاباما في استخدام اقل كميات من المبيدات في حقول القطـن مـنذ الاربعينات. في عام ١٩٩٨ استخدمت مبيدات تقل بمقدار ٢ مليون رطل في مكافحـة دودة اللوز ودودة البراعم في ستة ولايات منتجة للقطن بالمقارنة بما استخدم عام ١٩٩٥ (جـدول ٨-٥). بعـد ادخـال القطن البكتيري عام ١٩٩٦ وصل المتوسط الكلي لتطبـيقات ٢,٤ رشـة لمكافحـة حشرات براعم ولوز القطن في كل ولايات زراعة هذا المحصول (ويليامز ١٩٩٧). قبل ١٩٩٦ كان متوسط استخدام المبيدات عاليا (٢,٩ وحتي

٦,٧ رشـــات) في الولايات الستة التي استخدم فيها القطن البكتيري. خلال السنوات الثلاثة التـــي استخدمت فيها النباتات البكتيرية قل عدد مرات استخدام المبيدات الحشرية لمكافحة ديدان براعم ولوز القطن الي حوالي ١,٩ رشة (جدول ٨-٦). خفض عدد مرات استخدام المبـــيدات الحشرية يساوي خفض ١٢% من الكمية الكلية من المبيدات المستخدمة. بالطبع فـــان بعض استخدامات المبيدات الحشرية قد تكون ضرورية لمكافحة هذه الحشرات والتي لا تكافح ببروتين البكتريا المعبرة عنه في النباتات.

جـــدول (٨-٥): خفـــض اســـتخدام المبيدات الحشرية لمكافحة ديدان البراعم واللوز بعد ادخـــال القطن المحمي ببكتريا Bt (مقارنة استخدام المبيدات عام ١٩٩٥ مع استخدامات ١٩٩٨*

المبيد الحشري	استخدامات المواد الفعالة للمبيدات (× ١٠٠٠ رطل)
اميتراز (اوفاسين)	- ٤٢
سيفلوثرين (بيثرويد)	- ٣٥
سيبرمثرين (امو)	- ٨١
دلتامثرين (ديسيز)	+ ١١
اس-فينفاليرات (اسانا)	- ١٩
لمباداسيهالوثرين (كاراتية)	- ٨٥
ميثوميل (لانيت)	- ١٥٦
بروفينوفوس (كوراكرون)	- ١٠١٤
سبينوساد (تراسير)	+ ١٩
ثيود يكارب (لارفين)	- ٦٦٥
ترالومثرين (سكاوت)	- ٤
الفا - سيبرمثرين (فوري)	+ ١
المجموع	- ٢٠٤٤

**المصدر: Gianessi and Carpenter (١٩٩٩).*

اظهر الحصر المقارن بين مزارعي القطن في استراليا ١٩٩٨-١٩٩٩ ان الخفض فـــي استخدامات المبيدات الحشرية بعد ادخال النباتات القطن البكتيرية كان معنويا. اعتمادا علـــي منطقة الزراعة تفاوتت نسبة الخفض في استخدامات المبيدات من ٢٧ وحتي ٦١% بمتوســـط ٤٣% خفـــض. هذا يعادل خفض في عدد الرشات ٧,٧ رشة علي نباتات القطن البكتـــيرية Bt بالمقارنـــة بحقول القطن التقليدية. لقد كان الخفض في استخدام المبيدات في الصـــين المرتـــبط مـــع القطن البكتيري اكبر كثيرا (Xia واخرون ١٩٩٩). خلال اربعة

ســنوات مــن الاختبرات تناقص استخدام المبيدات الحشرية ٦٠-٨٠% عما هو الحال مع المبيدات الكيميائية في القطن التقليدي. في البلدان مثل الهند ذات النظم الزراعية الاستوائية والتي تعاني من ضغط انتخابي عالي للافات الحشرية مما استلزم استخدامات كميات كبيرة مــن المبــيدات كان الخفض في استخدام المبيدات مقارنا ومقابلا للخفض الذي لوحظ في الصين. من الصعب تقييم الخفض في كميات المبيدات المرتبطة مع ادخال الذرة البكتيري. الاصـــابة بالافة الاولية المستهدفة. هي ثاقبة الذرة الاوربي كانت تتباين من سنة لاخري. المبيدات الحشرية التي استخدمت لمكافحة ثاقبة الذرة قد تكون مطلوبة لمكافحة افات اخري اقل حساسية لبكتريا Bt. لقد اجاب ٣٠% من مزارعي الذرة البكتيرية انهم قاموا بزراعتة لمكافحــة ثاقبة الذرة الاوربية بغرض تقليل استخدام المبيدات ضد هذه الافة. لقد انخفضت مســاحات الذرة التي عوملت بالمبيدات الحشرية الخمسة الموصي بها لمكافحة هذه الحشرة بحوالي ٧% عام ١٩٩٨. لاغراض تحليل البيانات افترض البحاث ان ثلث الخفض تقريبا (٢,٥%) كانــت تــرجع الي ادخال الذرة المهندسة ببكتريا Bt مما ادي الي الاستنتاج بان كمــيات المبيدات نقصت بمقدار يساوي المطلوب لعلاج ٢ مليون اكر في عام ١٩٩٨. لقد اشار Rice (١٩٩٨) ان استخدامات المبيدات في حقول الذرة تناقصت بمقدار ١,٢ مليون رطل اذا تم زراعة ٨٠% من مساحة الارض المزروعة بالذرة المحور وراثيا ببكتريا Bt.

جــدول (٨-٦): عــدد معاملات المبيدات الحشرية في القطن لمكافحة ديدان براعم ولوز القطــن قــبل (١٩٩٥) وبعد (١٩٩٦-١٩٩٨) ادخال القطن البكتيري بالباسيلليس Bt*

الولاية	١٩٩٥	١٩٩٦	١٩٩٧	١٩٩٨
الاباما	٦,٧	٠,١	٠,٥	١,٤
اريزونا	٢,٩	١,٧	٠,٩	٠,٤
فلوريدا	٥,٧	١,١	١,٠	٢,٠
جورجيا	٣,٤	١,٧	٢,٥	١,٥
لويزيانا	٤,٧	٣,٩	٣,٢	٣,٥
ميسيسيبي	٥,٧	٢,٢	٢,٥	٢,٥

**المصدر: Williams (١٩٩٩).*

بعــد ذلــك كان غزو نباتات البطاطس البكتيرية معتدلا (٤%). بسبب ضرورة قيام المزارعيــن باســتخدام مبيدات حشرية لمكافحة الافات الاخري كان الخفض في استخدام

المبيدات قليل نسبيا. لقد بلغ متوسط الخفض في مزارع البطاطس البكتيرية رشة واحدة اقل مـن الرشات التي استخدمها مزارعي البطاطس العادية. القبول الحديث للبطاطس المقاومة لكـلا خنفساء كلورادو البطاطس والفيروسات النباتية. ادي الي التصريح من قبل مسئولي وكالة البيئة الامريكية USEPA بتوقعاتهم بان الاستخدام الواسع لهذا المنتج لابد وان تقلل الاسـتخدام الحالـي الجـاري للمبيدات الحشرية التي تكافح المن الناقل لفيروس البطاطس (جيانسـي وكارينـتر ١٩٩٩). النباتات التي تعول وتضاعف بكتريا Bt تزود المزارعين بحمايـة ذاتـية ضـد الافـات "built in" مما يخفض بشكل كبير الحاجة الي نقل وخلط واستخدام والتخلص من المبيدات الكيميائية التي تستخدم علي النباتات في الخارج. لقد امكن عن طريق هذا الاقتراب تقليل مخاطر الاستخدام الخاطئ والتوقيت غير المناسب وتعرض العمال للمبيدات. بالطبع وبسبب ان الكراي بروتين لا يمكن تحقيق الوقاية ضد كل الافات فـان اسـتخدامات اضـافية من المبيدات قد تكون مطلوبة علي النباتات البكتيرية لمكافحة الافات التي لا يمكن للكراي بروتين المنتج مكافحتها.

المكافحة العالية للافات: معظم يرقات ثاقبات الذرة الاوربية والجنوب غربية والتي تحاول الـتغذية علـي نـباتات الذرة البكتيرية Bt-protected corn تكون قادرة فقط علي عمل خـدوش قلـيلة علي ورقة الذرة ثم تموت خلال ٧٢ ساعة. هجن الذرة البكتيري تعبر عن بروتيـن الكـراي فـي كل اجزاء النباتات خلال الموسم ومن ثم تحقق ١٠٠% حماية من الاصابة بثاقبات الذرة. لقد اظهر الحصر الذي اجراه Wein Zierl واخرون (١٩٩٧) ان حشـرتان فقط من ثاقبات الذرة وجدنا في مساحة ٣,٥ اكر في الصنف yield-gard عام ١٩٩٨. نـباتات القطـن المهندسـة بالبكتريا Bt تقدم مكافحة فعالة لدودتي براعم الدخان واللوز القرنفلية. لقد تراوحت الفاعلية من ٧٠ الي ٩٠% علي هذه الافات (جدول ٨-٧). الاعمـار مـن الاول للـرابع من هذه الحشرات وجدت حساسة جدا للكراي بروتين بينما الاعمار الخامس قلت حساسيتها بشكل كبير لهذه المركبات (Halcomb واخرون ١٩٩٦). لقد امكن حماية نباتات البطاطس علي طول الموسم ضد كل اطوار خنفساء الكلورادو حيث لـم تكن هناك حاجة لاي معاملات اضافية بمبيدات حشرية اخري لمكافحة هذه الافة علي البطاطس.

جدول (٨-٧): النسبة المئوية لافات القطن الحشرية التي قتلت بواسطة القطن المهندس وراثيا ببكتريا Bt في القطع التجريبية.

الافات	النسبة المئوية للمكافحة
دودة براعم الدخان	٩٥
دودة اللوز القرنفلية	٩٩
ديدان لوز القطن (بل التزهير)	٩٠
ديدان لوز القطن (بعد التزهير)	٧٠

الانتاجية المحصولية العالية: حماية المحاصيل بالبكتريا تترجم الي زيادة معنوية في الانتاجية المحصولية. يتفاوت الفقد السنوي المحصولي بسبب الاصابة بثاقبة الذرة الاوربية بشكل عريض حيث تراوح من ٣٣ وحتي ٣٠٠ مليون بوشل لكل سنة(US DA ١٩٧٥). في عام ١٩٩٧ تم زراعة الذرة البكتيري Bt في مساحة ٤ مليون اكر وكانت الاصابة بدودة الذرة الاوربية ثقيلة. في هذه السنة حقق الذرة البكتيري محصول اولي ١٢ بوشل/اكر. بعد سنة واحدة كانت الاصابة بهذه الحشرة خفيفة جدا مما ادي الي زراعة الذرة البكتيري في مساحة ٢٤ مليون اكر. حينئذ اصبح الفلاحين الذين يزرعون ذرة الباسيلليس يحققون زيادة في الانتاجية المحصولية تساوي ٤,٣ بوشل/اكر او زيادة كلية ٦٠ مليون بوشل. في عام ١٩٩٥ كان متوسط الفقد في المحصول بسبب ديدان البراعم واللوز وقبل ادخال القطن البكتيري تصل الي حوالي ٤% في مقابل فقد ٢٩% في ولاية الاباما. بعد ثلاثة سنوات وصلت مساحات القطن البكتيري ١٧% من اجمالي مساحة القطن في امريكا وما يزيد عن ٥٠% من القطن النامي في الاباما. خفض التلف والضرر في هذه المساحة ادي الي زيادة المحصول الكلي للقطن الشعر بمقدار ٨٥ مليون رطل. بناء علي الاحصائيات تحقق ٤٠ دولار لكل اكر صافي عائد زيادة في امريكا. لقد اتضح ان الفلاحين الذين يزرعون القطن البكتيري حققوا فوائد صافية اكثر من ٩٢ مليون دولار في عام ١٩٩٨. اوضح James (١٩٩٩) ان القطن البكتيري والذرة Bt في امريكا وكندا حققتا زيادة في العائدات بسبب السيطرة علي الافات مقدارها ١٣٣ ، ١٢٤ مليون دولار علي التوالي عام ١٩٩٧ في مقابل زيادة ١٩٠,١ مليون دولار علي مستوي العالم في نفس السنة. حتي الان لم تتحقق زيادة معنوية في انتاجية البطاطس البكتيرية.

مكافحة اضافية للافات بواسطة الكائنات النافعة: الكراي بروتينات بشكل عام لها تاثير قليل او ليس لها تاثير ضار علي المفترسات والطفيليات الحشرية الطبيعية كما اتضح من الدراسات المعملية والحقلية مع خنافس ابي العيد والبق والدبابير والقمل المجنح الاخضر

وغـيـرها مــن مفصـليات الارجل. هذا يسمح ببقاء الكائنات النافعة في زراعات النباتات المهندسة ببكتريا الباسيلليس Bt حيث يمكن ان تساهم في السيطرة ومكافحة الافات الثانوية والتــي قـد تصبح مشكلة في حالة خفض تعداد الطفيليات والمفترسات من جراء استخدام المبيدات الحشرية التقليدية. لقد لاحظ Reed واخرون ١٩٩٣ ان مفصليات الارجل النافعة وحدها سيطرت علي الاصابة بحشرات المن لاقل من مستوي الضرر في حقول البطاطس مــن الصــنف المقــاوم بتولــيف بلس والتي لم تعامل بالمبيدات لمكافحة المن حيث كانت الحشــرات النافعة والعناكب منتشرة بكثرة. في هذه الحقول. هذا يعني ان الحشرات النافعة حققــت فــائدة كبــيرة في منع الانتشار الوبائي للعنكبوت الاحمر. علي نفس المنوال فان اســتخدام القطــن البكتيري في الصين مع تقليل استخدام المبيدات الحشرية حقق زيادة في متوســط اعــداد المفترسات بمقدار ٢٤% عما هو الحال في حقول القطن التقليدية (Xia واخرون ١٩٩٩). مع التسليم بان المحاصيل البكتيرية تتطلب استخدامات قليلة من المبيدات الحشــرية فــان مجامــيع الكائــنات النافعة تكون اكثر حماية مما يؤدي الي اقل تلف في المحصول والحاجة لقليل من تطبيقات المبيدات واحتمالات كبيرة لزيادة الانتاجية.

خفــض مســتويات التوكســينات الفطرية: ثاقبات الذرة التي تتغذي علي العيدان وانسجة الكــيزان تسبب تلف للحبوب النامية مما يمكن الجراثيم للفطريات المنتجة للتوكسينات من انــواع الفيوزاريوم من الانبات. يحدث انبات للجراثيم وتضاعف للفطر مما يسبب عفن في الكــيزان والحبوب مع انتاج زائد من عائلة الميكوتوكسينات Fumonisin. الفيومونيزين عبارة عن توكسينات فطرية تحدث الموت والشلل في الاحصنه والنعام (Norred ١٩٩٣) كمــا ان لها ارتباط بالحالات الوبائية لسرطان المرئ والكبد في فلاحي افريقيا (Marasas واخــرون ١٩٨٨). بسبب ان الكراي بروتين Ab 1 يقلل او يمنع التلف في الانسجة التي تحدثــة ثاقــبات الذرة في نباتات الذرة والتي تنتج بروتين الكراي 1Ab في النبات تكون جراثيم الفطر اقل قدرة علي الانبات والتكاثر. لقد اوضح Munkuold واخرون (١٩٩٧ ، ١٩٩٩) ان مســتويات عفــن الكــيزان الفيوزاريومــي والمســتويات الــناتجة من السم الميكوتوكسين فيومونيزين انخفضت في شكل درامي كبير في نباتات الذرة البكتيرية مقارنة بالنبات غير البكتيرية كما لوحظ خلال سنوات طويلة. اظهرت نتائج البحوث التي اجريت في جامعة ايوا ووزارة الزراعة الامريكية حدوث خفض حتي ٩٦% في مستويات اعفان الكــيزان الفيوزاريومــية في الكيزان التالفة بالحشرات مع هجن الذرة البكتيرية بالمقارنة بالهجــن العادية. في نفس السنة أي عام ١٩٩٧ وهي السنة التي حدثت فيها اصابات عالية ثاقــبة الــذرة اتضــح حــدوث خفض ٩٠-٩٣% في مستويات الفيومونيزين. لقد استنتج

Munkuold واخرون (١٩٩٧) ان الهندسة الوراثية للذرة لجعلة مقاوم للحشرات قد يزيد مــن امانة علي الحيوانات والانسان. قيمة الفروق في تركيزات الفيومونيزين بين النباتات المهندســة وراثــيا والعاديــة وجدت كافية لاحداث السمية من حبوب الذرة علي المزارع الخلويــة الادمية. لقد لوحظ نفس الفقد (٩٠%) تقريبا في مستويات الفيومونيزين في الذرة البكتيري النامي في ايطاليا. ان مستويات خفض الفيومونيزين تعتمد علي الاختلافات البيئية وبيــن الاصـــناف لا يوجد معلومات كافية عن تاثير الذرة البكتيري علي الميكوتوكسينات الاخـــري مثل الافلاتوكسينات. يبدو ان مستويات الافلاتوكسينات متباينة لحد كبير مع عدم وجود ادلة تشير الي ارتباط ثابت بينها وبين وجود بكتريا الباسيلليس Bt.

اعتبارات الامان في النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt:

- المنتجات الميكروبية الباسيللية Bt من اكثر المبيدات الحيوية استخداما في العالم وقد احتلــت ١-٢% مــن الســوق العالمــي للمبيدات الحشرية في التسعينات (Baum واخرون ١٩٩٩). الكراي بروتينات ذات تخصص عالي للافات الحشرية المستهدفة حيــث قد يكون تاثير قليل او تكون عديمة التاثير علي الكائنات الاخري. علي امتداد ٤٠ عامــا مــن الاســتخدام العالمي لم تحدث المنتجات الميكروبية Bt ايه تاثيرات معاكســة علي صحة الانسان والبيئة. منذ بداية تسجيل هذه المنتجات في امريكا منذ ١٩٦١ يوجد الان تسجيلات جارية علي الاقل ١٨٠ منتج بكتيري (EPA ١٩٩٨ - ب) في امريكا في مقابل ما يزيد عن ١٢٠ منتج ميكروبي في دول الاتحاد الاوربي. لقــد اســتخدمت ومازالــت هذه المركبات مستمرة في الاستخدامات الزراعية وفي مكافحــة نــاقلات الامــراض. لقــد قدرت وكالة EPA اجراء العديد من الدراسات التوكســيكولوجية علي منتجات الباسيلليس واتضح عدم حدوث تاثيرات معاكسة مما دعي الي الاستنتاج بان هذه المركبات غير سامة او ممرضة للانسان (EPA ١٩٩٨ -أ). فــي اصــدارات متطلبات التسجيل للمبيدات من قبل الوكالة اشارت الوثائق ان منتجات الباسيلليس ليس لها تاثيرات معاكسة غير معقولة علي الانسان او البيئة وكل استخدامات هذه المنتجات مؤهلة او جديرة بالتسجيل. لقد اشار تقدير الامان الكيميائى في البرنامج الدولي التابع لمنظمة الصحة العالمية (WHO) ان بكتريا الباسيلليس Bt ومنــتجاتها لــم تسبب ايه تاثيرات معاكسة علي صحة الانسان عندما توجد في مياه الشرب او الطعام (IPCS ٢٠٠٠).

- تســتخدم مستحضـــرات Bt علي نطاق تجاري في الولايات المتحدة الامريكية وكندا والمكســيك وغــيرها من دول امريكا الجنوبية وفي كل دول الاتحاد الاوربي. كذلك يشــيع اســتخدام هــذه المنتجات في العديد من الدول الاخري مثل روسيا والصين واســتراليا ودول اوربا الشرقية. لقد استعرضت هيئة الصحة العالمية WHO حديثا قــاعدة بــيانات عن الامان العالي لهذه المستحضرات البكتيرية Bt وخلصت الي : بســبب الكيفــية الخاصة لاحداث الفعل فان منتجات بكتريا Bt لا تسبب اية اضرار علي الانسان او غيرة من الفقاريات ولحد كبير الفقاريات غير المستهدفة حيث وجدت خالية تماما من البكتريا باسيلليس والمنتجات الفعالة بيولوجيا بخلاف البروتينات التي تكــافح الحشــرات ICPS (IPCS ٢٠٠٠). البيانات التالية والاسباب العلمية تعضد الامان البيئي وعلي صحة الانسان من خلال تجارب تقييم امان الكراي بروتينات:

- ♣ نــتائج دراسات السمية الحادة عن طريق الفم او الغذاء اشارت الي ان العديد من المنــتجات الميكروبــية لبكتريا الباسيلليس التي تحتوي علي مخاليط مختلفة من الكراي بروتينات لم تظهر أي سمية علي الثدييات.
- ♣ الدراسات علي البروتينات الممثلة من ثلاثة اقسام للكراي بروتينات (كراي ١،٢، ٣) اكــدت ان هذه المواد غير سامة علي الثدييات عندما تعامل عن طريق الفم بجــرعات عالية. كل البروتينات من اقسام الكراي بروتينات هذه تنهار بسرعة في سائل المعدة.
- ♣ الكراي بروتينات المحورة وراثيا (الكراي بروتينات التي لم حدثت فيها التغيرات بالطــرق الجزيئية) لم تحدث ايه تاثيرات صـحية مميزة عندما تؤخذ عن طريق الفــم. البــيانات عــن الكراي بروتينات التي تحدث طبيعيا تنطبق علي الكراي بروتيــنات الاصــلية والمحــورة وراثــيا التي تنتج في النباتات المحمية ضد الحشرات.
- ♣ الكــراي بروتينات ذات طريقة فعل معقدة وعالية التخصص. بالاضافة الي ذلك توجد مواقع ارتبط خاصة في اللافقاريات المستهدفة وتتطلب ان يحدث الكراي بروتيــن النشــاط الابــادي ضد الحشرات. التحليل المناعي الخلوي الكيمياتي للكــراي 1A immunocytochemical analysis لــم يظهــر وجود مواقع ارتباط مقارنة في الثدييات او في الحشرات التي لا تتأثر بهذه البروتينات.

- المنـــتجات الميكروبـــية الباســـيللية Bt ذات تـــاريخ طويل (٤٠ سنة تقريبا) من الاســـتخدام الامن. يوجد تقريرين فقط اشارا الي التاثيرات المعاكسة المؤثرة في الانســـان مـــن جراء استخدام المنتجات الميكروبية Bt واي منهما لم يشير الي الـــتعرض للكـــراي بروتيـــنات (EPA ١٩٨٨-أ ، Mc chintock واخرون ١٩٩٥).

التاثيرات الضارة علي صحة الانسان Human health implications

المبـــيدات الميكروبـــية الباسيللية Bt غير سامة علي الثدييات. العديد من الدراسات الخاصـــة بالامان علي الحيوانات والتي اجريت علي مدي اربعين سنة اظهرت ان مخاليط المبيدات الحشرية الميكروبية Bt التي تحتوي علي بروتينات غير سامة عندما تتغذي عليها الثديـــيات. الدراسات التوكسيكولوجية التي سلمت الي وكالة حماية البيئة الامريكية EPA لتعضـــيد تسجيل تحت انواع الباسيلليس ثورينجنسيز فشلت في اظهار ايه تاثيرات معاكسة معـــنوية في زيادة وزن الجسم او الملاحظات السريرية او في الانسجة. بشمول اكبر وجد ان هذه الدراسات اكدت غياب السمية الحادة وتحت الحادة والمزمنة عن طريق الفم ترتبط بالمبـــيدات الميكروبـــية (جـــدول ٨-٨) هذه النتائج وثيقة الصلة ببيانات تقويم امان النبات المهندســـة وراثـــيا ببكتريا الباسيلليس لان التحضيرات الميكروبية تحتوي علي نفس اقسام الكـــراي بروتيـــنات (كراي ١ ، ٢ ، ٣) والتي ادخلت وهندست في النباتات المحمية ضد الحشرات (جدول ٨-٩).

- اظهرت دراسات السمية الحادة عن طريق الفم التي اجريت علي الجرذان والارانب عـــدم حدوث وفيات مع الجرعات العالية المختبرة والتي تتراوح من عدة الاف من المليجرامات من المنتج الميكروبي Bt لكل كيلوجرام من وزن الجسم (الجدول ٨-٨) الدراســـات المذكورة في هذا الجدول لا تظهر ايه تاثيرات ضارة في الحيوانات اســـتنادا لعدم حدوث موت او تغيرات في وزن الجسم واستهلاك الغذاء وكذلك عدم ظهـــور ايـــه اعـــراض مرضية شاملة. اظهرت الدراسات الخاصة بالسمية تحت المزمـــنة في الجرذان ان المستويات عديمة التاثيرات "no effect levels" وصلت حتـــي ٨٤٠٠ مللجـــم Bt منتج ميكروبي لكل كيلوجرام من وزن الجسم/يوم. في دراســـات الـــتغذية المزمـــنة لمدة سنتان في الجرذان لم يلاحظ أي نقص في وزن الجســـم المكتسب في الاناث التي جرعت جرعة ٨٤٠٠ مللجم/كجم/يوم. في غياب

التاثيرات المعاكسة الاخري لم تؤخذ هذه التاثيرات علي انها ذات اهمية من الناحية التوكسيكولوجية كما ان الجرعة ٨٤٠٠ مللجم/كجم/يوم اعتبرت هي المستوي عديم التاثير الملحوظ NOEL (McClintock واخرون ١٩٩٥). في دراستان مستقلتان تـم تغذية المتطوعين الادميين ١٠٠٠ مللجم من تجهيزات Bt الميكروبية كل يوم علـي امتداد خمسة ايام ولم تظهر عليهم ايه اعراض سمية او ايه تاثيرات مرضية (جدول ٨-٨). تجهيزات الباسيلليس Bt التي استخدمت في دراسات تغذية الادميين كانـت تحـتوي علي جينات تشفر عائلات الكراي بروتينات التالية. كراي 1Aa ، كراي 1Ab ، كراي 1B ، كراي 2A.

- لقـد احتوت وثائق دلائل الوكالة EPA لاعادة تسجيل مستحضرات Bt الميكروبية وغـيرها من الدراسات المرجعية علي مراجع اضافية عن دراسات توكسيكولوجية علـي الثدييـات والتـي تـم فيها معاملة مستحضرات Bt عبر واحد من الطرق والمداخل من التعرض بخلاف الفمي nonoral مثل التعرض الرئوي او الجلدي او عـن طـريق العيون او الحقن البريتوني. لقد اجريت هذه الدراسات لتقويم القدرة المرضـية/العـدوي لبكـتريا Bt في المستحضرات الميكروبية. لقد اعتبرت هذه الدراسـات كذلـك كمعايير للجودة للتأكد من عدم وجود توكسينات البروتينات غير الكراي (مثل الاكسوتوكسينات) والتي يمكن ان تنتج في بعض سلالات الميكروبات Bt. عـندما عوملت جرعات كبيرة (١٠^٨ CFUS) من الكائنات الدقيقة الباسيللية Bt عن طريق الحقن في القوارض اوضحت بعض من التقارير حدوث وفيات في حيوانات التجارب في بعض الظروف. لقد لوحظ الموت كذلك في القوارض التي تم حفظها بنفس الجرعات الكبيرة من البكتريا غير المرضية مثل الباسيلليس سبتيلليس. حيـث ان المـوت قـد يحدث بعد حقن الجرعات الكبيرة من الكائنات الدقيقة غير المرضـية فـان الموت الذي حدث في القوارض التي اعطيت جرعات كبيرة من مـيكروبات Bt لا تـرجع الـي الكراي بروتينات الموجودة في مستحضرات Bt الميكروبـية (EPA ١٩٩٨-ا). نـتائج دراسات الحقن والحساسية لم تذكر في هذا المقـام لانهـا غـير وثيقة الصلة بتقويم المخاطر الصحية المؤثرة بسبب التعرض الغذائي للكراي بروتينات التي تنتج في النباتات.

جـدول (٨-٨): تقييم سمية الباسيلليس ثورينجينسيز على الثدييات ـ المبيدات الحشرية الميكروبية (التعرض عن طريق الفم)

Mammalian Toxicity Assessment of *Bacillus thuringiensis*—Microbial Pesticides (Oral Exposure)[a]

Bt Microbial	Cry gene content	Test substance	Type of study	Results (NOEL)[b]	Toxicity findings	Reference
Kurstaki (Crymax)	Cry1Ac Cry2A Cry1C	Technical	Acute oral toxicity/ pathogenicity (rat)	>2.5–2.8 × 10^8 CFUs/rat	No evidence of toxicity	Carter and Liggett (1994) and EPA Fact Sheet (1996a) (Ecogen)
Kurstaki (Lepinox)	Cry1Aa Cry1Ac Cry3Ba	Technical	Acute oral toxicity/ pathogenicity (rat)	>1.19 × 10^8 CFUs/rat	No evidence of toxicity	Barbera (1995)
Kurstaki (Raven)	Cry1Ac Cry3Aa Cry3Ba	Technical	Acute oral toxicity/ pathogenicity (rat)	>4 × 10^8 CFUs/rat	No evidence of toxicity	Carter *et al.* (1993)
Kurstaki (Cutlass)	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2A Cry2Ab	Technical	Acute oral toxicity/ pathogenicity (rat)	>10^8 CFUs/ml, dosing rate is 1 ml/rat	No evidence of toxicity	David (1988)
Tenebrionis (San Diego)	Cry3Aa	Technical	Acute oral toxicity (rat)	>5050 mg/kg	No evidence of toxicity	EPA Fact Sheet (1991) (Mycogen)
Kurstaki (Dipel)	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa	Technical	Acute oral (rat)	≥4.7 × 10^{11} spores/kg	No evidence of toxicity	EPA Fact Sheet (1986) (Abbott) and McClintock *et al.* (1995)
Kurstaki (Dipel)	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa	Technical	13-week oral—(gavage) (rat)	>1.3 × 10^9 spores/kg	No evidence of toxicity	McClintock *et al.* (1995)
Kurstaki (Dipel)	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa	Technical	13-week oral—(feed) (rat)	>8400 mg/kg/ day	No evidence of toxicity	McClintock *et al.* (1995)
Kurstaki (Dipel)	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2A	Technical	2-year chronic—rat (feed)	8400 mg/kg/ day	Statistically significantly decreased body weight gain in females from week 10 to week 104 (not considered related to Cry proteins); no infectivity/ pathogenicity was found.	McClintock *et al.* (1995)
Kurstaki	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa	Technical	Human—oral	1000 mg/adult or 1 × 10^{10} spores daily for 3 days	No toxicity/infectivity; all blood cultures were negative; 5 of 10 patients showed viable *Bt* microbes in stool samples 30 days postfeeding.	EPA Fact Sheet (1986) (Abbott) and McClintock *et al.* (1995)
Berliner	Cry1Ab Cry1B	Technical	5-day human oral exposure	1000 mg/adult or 3 × 10^9 spores in capsules daily for 5 days[a]	All subjects remained well during the course of the experiment (~5 weeks) and all laboratory findings were negative (subjects were evaluated before treatment, after the 5-day treatment period, and 4 to 5 weeks posttreatment).	Fisher and Rosner (1959)
Israelensis (Teknar)	Cry4A Cry4B Cry10A Cry11A Cyt1Aa	Technical	Acute oral toxicity/ infectivity (rat)	>1.2 × 10^{11} spores/kg	No evidence of toxicity	McClintock *et al* (1995)
Israelensis (h-14)	Cry4A Cry4B Cry10A Cry11A Cyt1Aa	Technical	13-week oral (feed) rat	>4000 mg/kg/ day	No evidence of toxicity	McClintock *et al.* (1995)

[a] Doses are expressed in various units for *Bt* microbial technical-grade materials, e.g., mg technical ingredient/kg body wt, or more commonly CFUs or spores/animal or kg body wt. For purposes of comparison with Table 8, it would have been desirable to convert all doses into mg/kg units. Unfortunately, this is not possible since the colony forming units (CFUs) or spore count can range from approximately 10^9 to 10^{11} per gram of technical-grade *Bt* microbial material (McClintock *et al.*, 1995). Second, the Cry protein content in different *Bt* microbial preparations may vary depending on the microorganism and fermentation conditions. It is possible to conclude from Table 7 that the Cry2 protein dosages administered to animals in the referenced studies ranges from milligrams to grams/kg body wt.

[b] Highest dose in the toxicity study that produced no adverse effects. In all referenced studies, the highest tested dose produced no test article related adverse effects.

جـدول (٨-٩): سـمية الكراي بروتينات للباسيلليس ثورينجينسيز علي الثدييات المعبر عـنها فـي النـباتات: حسـاب حدود التعرض الغذائي (NOEL في دراسات الحيوانات/مستويات تعرض الانسان)

Mammalian Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins[a] Expressed in Crops: Calculated Dietary Exposure Margins (NOEL Animal Study/Human Exposure Levels)

Cry protein	Type of study	Results (NOEL)[a] mg/kg/day	Toxicity findings	Dietary exposure margin[c]	Reference
Cry1Ab	Acute oral toxicity (mouse)	>4000	No evidence of toxicity	>22,000,000 (corn)	EPA Fact Sheet (1996b) (Monsanto)
Cry1Ab	Acute oral toxicity (mouse)	>3280	No evidence of toxicity	>3,000,000,000 (corn)	EPA Fact Sheet (1995a) (Ciba Seeds)
Cry1Ab	28-day mouse drinking water study	>0.45 via drinking water	No evidence of toxicity, no evidence of immunological responses	>20,000 (tomato)	Noteborn *et al.* (1994)
Cry1Ab	31-day rabbit drinking water study	>0.06 via drinking water	No evidence of toxicity	>2600 (tomato)	Noteborn *et al.* (1994)
Cry1Ac	Acute oral toxicity (mouse)	>4200	No evidence of toxicity	>22,000,000 (cottonseed oil) >16,000,000 (tomato)	EPA Fact Sheet (1995c) (Monsanto)
Cry1Ac	Acute oral toxicity (mouse)	>5000	No evidence of toxicity	>560,000,000 (corn)	Spencer *et al.* (1996) (Dekalb)
Cry2Aa	Acute oral toxicity (mouse)	>4011	No evidence of toxicity	>1,000,000,000 (cottonseed oil)	Monsanto, unpublished
Cry2Ab	Acute oral toxicity (mouse)	>1450	No evidence of toxicity	2,800,000 (corn)	Monsanto, unpublished
Cry3A	Acute oral toxicity (mouse)	>5220	No evidence of toxicity	>652,500 (potato)	EPA Fact Sheet (1995b) (Monsanto)
Cry3Bb	Acute oral toxicity (mouse)	>3780	No evidence of toxicity	>291,000 (corn)	Monsanto, unpublished

١) علـي عكـس جـدول (٨-٨) تم اختبار الكراي بروتينات فردية وليست علي صورة مخاليط.

٢) اعلـي جرعة في دراسة السمية لا تنتج تاثيرات معاكسة. في كل الدراسات المرجعية اخذت اعلي جرعات لا تنتج تاثيرات معاكسة.

٣) حساب مدي التعرض

$$\text{مدي التعرض} = \frac{\text{دراسة سمية NOEL (ميكروجرام / كجم وزن جسم/يوم)}}{\text{الاستهلاك الادمي للكراي بروتين (ميكروجرام/كجم وزن/يوم)}}$$

$$\text{الاستهلاك الكراي بروتين (ميكروجرام/وزنجسم/يوم)} = \frac{\text{الاستهلاك الادمي للغذاء (جم/يوم)} \times \text{تركيز الكراي بروتين}}{\text{متوسط وزن الجسم الادمي (٦٠ كيلوجرام)}}$$

حسـابات الاسـتهلاك افترضـت عدم حدوث فقد في الكراي بروتين خلال تجهيز الغـذاء. قـيم الاسـتهلاك الادمي للغذاء تحصل عليه من قاعدة البيانات USDA TAS (USDA ١٩٩٣) GEMS / FRD (WHO ١٩٩٨). المحاصيل بين الاقواس يشير الي المحصـول الذي يتم فيه انتاج الكراي بروتين بناء علي ما نشر ووفق عليه من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA.

متطلـبات اختـبار الامان لتسجيل منتجات البكتريا Bt كانت محط الاعتبار طوال السنوات مع استكمال الدراسات الخاصة بالسمية/المرضية في اعوام ١٩٨٢، ١٩٨٩ ومرة اخـري فـي ١٩٩٨ (EPA ١٩٩٨ أ ، ب). بينما اجريت دراسات الامان تحت المزمنة والمزمـنة مـع ظهور اول منتجات ميكروبية باسيللية فان الوكالة EPA قدرت ان التقويم للاضرار الحادة acute hazard assessment كافية لتقويم امان المنتجات الميكروبية Bt الجديـدة. لقد بني هذا القرار علي حقيقة ان الكراي بروتينات في منتجات بكتريا Bt تعمل مـن خلال التقنيات الحادة لمكافحة الافات الحشرية وهذه التقنيات لا تعمل في الانسان. لقد اعتـبرت بطاريه من دراسات السمية الحادة/المرضية كافية من قبل الوكالة لاجراء تقويم المخاطـر للمبـيدات الميكروبـية. بالاضـافة الي ذلك اتفق علي ان الدلتا-اندوتوكسينات للباسـيلليس Bt تؤثـر علـي الحشرات من خلال تقنية معروفة جيدا حيث ترتبط بمواقع متميزة علي مستقبل متميز علي غشاء الخلية في معدة الحشرة ومن ثم تكون ثقوب واحداث خلـل في التوازن الاسموزي ليس معروفا وجود مواقع استقبال متماثلة في انواع الثدييات يمكـن ان تـتاثر بصرف النظر عن عمر الفرد. لذلك توجد تاكيدات مقنعة بعدم احتمالات احداث اضرار علي الرضع والمواليد والاجنة من جراء التعرض الغذائي لمخلفات Bt.

⊙ الكـراي بروتينات التي تنتج في النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا Bt غير سامة علي الثدييات.

لتقويم امان الكراي بروتينات المعبر عنها في النباتات فان اختبار السمية الحادة مع اختبارات السلوك الهضمي خارج الحيوان تعتبر مناسبة وكافية لتقويم المخاطر الصحية من جـراء التعرض الغذائي للكراي بروتينات (Sjoblad واخرون ١٩٩٢). اختبارات احداث المرضية والعدوي والتي تجري علي المادة الفعالة الخام من ميكروب Bt الحي تعتبر غير مناسـبة لاختبارات الكراي بروتينات. اختبارات التعرض الجلدي او عن طريق الاعين او الاستنشـاق في العادة غير مناسبة حيث ان تعرض العمال للكراي بروتينات المعبرة عنها

فـــي النباتات يعتبر في حيز الاهمال أي غير ذات قيمة او موضوع. في النباتات يعبر عن الكراي بروتينات بمستويات منخفضة (جزء في المليون) ويوجد داخل خلايا النباتات. جميع اختبارات السمية علي الثدييات لافراد الكراي بروتينات التي يعبر عنها في النباتات المحمية بالباســيلليس اظهرت عدم حدوث أي نوع من السمية. لم تلاحظ ايه ارتباطات بين المعاملة والتاثــيرات المعاكسة في أي من دراسات السمية الحادة علي الثدييات عن طريق الفم التي اجريت علي الكراي ١ ، الكراي ٢ ، الكراي ٣ من البروتينات (جدول ٨-٩). المستويات عديمــة التاثير الملحوظ NOELs لهذه الكراي بروتينات تتراوح حتي ٥٢٢٠ مللجم/كجم. مستويات التعرض هذه التي لا تنتج سمية تتراوح من الاف وحتي ملايين المرات اعلي من لتعرض الغذائي لهذه البروتينات (جدول ٨-٩). مثال ذلك فان مستوي تعبير Cry1Ab في حــبوب الــذرة تقــارب من واحد جزء في المليون. الفرد بوزن ٦٠ كجم يجب ان ياكل ١٢٠٠٠٠ كجــم/يوم من حبوب الذرة كي يتحقق نفس التاثير الحاد للجرعة العالية ٤٠٠٠ مللجم/كجم في بروتين Cry1Ab الذي لا ينتج تاثيرات معاكسة عندما تتغذي علي الفئران (جــدول ٨-٩). بناء علي نقص التاثيرات السامة والحدود الكبيرة للامان للتعرض الغذائي تــم اســتنتاج ان هــذه الكراي بروتينات لا تملك ايه مقومات لاحداث مخاطر علي صحة الانسان والحيوان.

Θ الكراي بروتينات عالية التخصص Highly specific:

الثدييات ومعظم الانواع الاخري ليست حساب للكراي بروتينات. لقد تم تفسير ذلك جزئــيا من خلال الحقيقة ان الظروف المطلوبة لحدوث الخطوات المعقدة في احداث الفعل كمــا ذكــرت بواســطة English and Slatin (١٩٩٢) لا توجد في الثدييات او معظم اللافقاريــات. الكــراي بروتيــنات يجــب ان تذوب بداية. القسم الكراي -١ من الكراي بروتيــنات يتطلــب وسط قلوي كي يذوب مع درجة حموضة عشرة او اعلي حتي يكون الذوبــان جــيد. مــع درجــة حموضة ١,٢ في القناه الجوفمعوية في الانسان فان الكراي بروتيــنات ذات محدوديــه شديدة في الذوبان. بعض الكراي بروتينات يجب ان تهضم مع الــتحلل البروتيني الي الصورة الفعالة في ابادة الحشرات. الكراي بروتينات يجب ان تبقي فعالة بدرجة تفوق الاعتبار. اظهرت العديد من التجارب ان الكراي بروتينات تنهار بسرعة تحــت الظــروف التي تحاكي ظروف الجوفمعوية في نظم الثدييات. لذلك فان هذه الكراي بروتيــنات تــنهار بسرعة وتفقد فاعليتها بمجرد الاستهلاك. في النهاية فان الارتباط علي المســتقبل في الغشاء الطرفي في الخلايا الطلائية للمعي الاوسط يؤدي الي صورة مرتبطة

علي بروتينات مستقبل المعي الاوسط الجزئ في طرف فرشة الغشاء ، وفي النهاية تكوين قنوات وثقوب.

الارتـباط علـي هـذه المستقبلات مطلوب حتي يحدث الكراي بروتين أي فاعلية ونشـاط. اذا لم يحدث الارتباط علي المستقبل فان الكراي بروتين يكون عديم الفاعلية علي الكائـن الحـي. تحصـل الباحث Noteborn واخرون (١٩٩٣) علي عدم حدوث ارتباط متخصـص للكـراي 1Ab بروتيـن علـي نسيج القناة الجوفمعوية داخل جسم الجرذان والفـئران. لقـد طور هؤلاء البحاث طريقة تحليل مناعية خلوية كيميائية في خارج جسم الحـيوان (للكشـف عـن ارتباط الكراي بروتين في خلايا الحشرة) لتقييم ارتباط بروتين Cry1Ab ي قطاعـات نسـيج معـدة الثدييات. تحليل قطاعات انسجة الجرذان والفئران والقردة والانسان لم يظهر اية مواقع ارتباط الكراي 1Ab في هذه الانسجة. لقد تعضد هذه النتـيجة لدراسـات هوفمـان واخرون (١٩٨٨) حيث لم يتمكنوا من الكشف عن ارتباط متخصـص للكـراي بروتيـن علي تجهيزات الاغشية الخلوية لامعاء الجرذان. لقد حدث تعضيد اضافي للامان الغذائي للكراي بروتينات علي الانسان والحيوانات بناء علي النتائج السابقة بسبب:

١) نقص الظروف المناسبة لاذابة الكراي بروتينات.

٢) اعتبار الكراي بروتينات بمجرد التناول والاستهلاك.

٣) نقص المستقبلات المتخصصة للكراي والمطلوبة لاحداث الفاعلية.

ʘ الكراي بروتينات تهضم بسرعة Rapidly digested:

لقـد اتضح ان الكراي ١ ، ٢ ، ٣ بروتينات تنهار بسرعة خارج الكائن الحي in vitro مع استخدام سوائل تماثل تلك الموجودة في المعدة. اظهرت نتائج التحليلات السبعة خـارج الكائن الحي والتي اجريت علي بروتينات الكراي ١ ، ٢ ، ٣ حدوث انهيار سريع خلال ٣٠ ثانية في نماذج تحاكي ظروف الهضم (٨-١٠). الكراي بروتينات التي تتراوح فـي الحجـوم من ٦٠ - ١٣٠ kda تنهار في نماذج الهضم الي ببتيدات عديدة اقل من ٢ كـيلو دالتون في الحجم والتي تترجم الي اقل من ١٠ احماض امينية في الطول وهو الحد الادنـي للفصـل فـي تحلـيل ويسترن هذه النماذج خارج الجسم اقل استشعار من النظم الجوفمعويـة للانسان والحيوان مما دعي الي الاقتراح بان الكراي بروتينات تنهار بسرعة وبدرجـة كبـيرة بمجرد الاستهلاك الهدم السريع لاقسام الكراي ١ ، ٢ ، ٣، للبروتينات بعد التناول الغذائي يحد ويقلل من كفاءة البروتين في احداث أي تفاعل حساسية حيث ان درجة

الامتصـــاص ســتقل بشــكل كبير. المواد الغذائية المحدثة للحساسية عادة تكون ثابتة في النموذج الجوفمعوية بينما البروتينات الغذائية الشائعة التي لا يعرف عنها احداث للحساسية تنهار بسرعة في السائل المماثل لسائل المعدة (Metcalfe واخرون ١٩٩٦ ، Astwood واخرون ١٩٩٦). بالاضافة الي ذلك فان هذه الكراي بروتينات في الطعام بمستويات قليلة للغايــة تقلل لحد كبير درجة التعرض ومن ثم يقل الامتصاص. اظهرت الدراسات اللاحقة عــن الحساســية عــدم وجود هذه الظاهرة مع الكراي بروتينات ١ ، ٢ ، ٣ . علي مدي الاربعين عاما منذ الاستخدام التجاري للمنتجات الميكروبية الباسيللية لم يثبت او يظهر اية تاثيرات في احداث الحساسية.

جـــدول (٨-١٠): هضـــم كـــراي بروتينات بكتريا Bt خارج الكائن الحي في سائل معدة محاكي.

كراي بروتين	نتيجة الهضم	مخرجات الهضم	المصدر
Cry1Ab	إنهيار خلال ٣٠ ثانية	تحول الي مركز مقاوم للتربسين	EPA Fact Sheet (1996b) (Monsanto)
Cry1Ab	إنهيار خلال دقيقة	إنهيار سريع في جو البيسين	EPA Fact Sheet (1995a) (Ciba Seeds)
Cry1Ab	إنهيار جوهري	إنهيار جوهري من خلال الهضم	Noteborn et al. (1994)
Cry1Ac	إنهيار خلال ٣٠ ثانية	تحول الي مركز مقاوم للتريبسين	EPA Fact Sheet (1995c) (Monsanto)
Cry1Ac	إنهيار خلال ٣٠ ثانية	نقص تركيز البيسين ١١٠ مرة – حدث إنهيار لاقل من حدود التقدير خلال ٥ دقائق	Spencer et al. (1996) (Dekalb)
Cry2Aa	إنهيار خلال ٣٠ ثانية	تحول الي مركز مقاوم للتربسين	Monsanto, unpublished
Cry3A	إنهيار خلال ٣٠ ثانية	تحول الي مركز مقاوم للتربسين	EPA Fact Sheet (1995b) (Monsanto)

ʘ الكـــراي بروتيـــنات لمحـــورة ليس لها ايه نواحي او تاثيرات خاصة no unique concerns:

الكراي بروتينات في النباتات المحمية وراثيا ببكتريا الباسيللس Bt تختلف قليلا ان لم تختلف علي الاطلاق عن اقرانها من الكراي بروتينات الطبيعية. بعض البروتينات التي تـــم التعبير عنها في النباتات متفرعة وتماثل البروتينات التي تحدث طبيعيا بعد ان تتكسر وتنقســـم في معدة الحشرة بينما البعض الاخر قد يختلف عن البروتينات الطبيعية في القليل مـــن الاحماض الامينية. لا يوجد سبب للتوقع بان هذه البروتينات المحورة وراثيا تملك اية تاثـــيرات علي صحة الانسان بالمقارنة بانواعها الطبيعية. في الحقيقة توجد ادلة ان الكراي بروتيـــنات المحـــورة تخلق فعلا في الطبيعة. يبدو ان الكراي 1Ab اندوتوكسين يخلق من الدمـــج بين ancestral cry 1Aa وجينات التوكسين مماثل cry 1A6 (Geiser واخرون ١٩٨٦). علـــي نفـــس المنوال فان تصفيف نتائج الحمض الاميني للكراي 1Ca ، 1Cb ، 1Ea ، 1Eb تلقي الضوء وتشير الي احتمال وجود موقع دمج قريب في الحمض الاميني

٤٥٠. لقد ادي تحليل هذا الاحتمال الي الاقتراح بان الدمج بين جينات الكراي القريبة تعتبر من العمليات العادية في نشوء جينات الكراي.

تحديد وتقرير امان الغذاء من المحاصيل المهندسة ببكتريا Bt:

لقد تم تقرير وتحديد امان النباتات المحمية وراثيا ببكتريا Bt والموجودة حاليا في الاسواق كغذاء للانسان او علف للحيوان. بالاضافة الي تقييم امان الكراي بروتينات فان الاجزاء التي تؤكل من المحاصيل والبروتينات العلامة للجين تم فحصها كذلك. لقد اتضح ان محاصيل الذرة والقطن والبطاطس المحمية ببكتريا Bt متكافئة لحد كبير (مقارنة في التركيب) مع اقرانها غير المهندسة ببكتريا Bt. لم تلاحظ اختلافات معنوية في تركيب المكونات مثل الحبوب والبذور والدرنيات والزيت والقش او اية نواتج ثانوية اخري بين المحاصيل المهندسة وراثيا ببكتريا Bt واقرانها غير البكتيرية (Sanders واخرون ١٩٩٨). الاختلاف الوحيد يتمثل في ان النباتات الباسيللية تقدم حماية ضد بعض الافات من خلال التعبير عن كراي بروتين خاصة علي امتداد البروتين العلامه وكلاهما ثبت اما نهما للاستهلاك الادمي. تحليل الخصائص الزراعية والمورفولوجية للنباتات المحمية ببكتريا Bt تؤكد كفاءة وثبات الصفات المغروسة ونقص التاثيرات غير المقصودة بشكل كبير والتي قد ترجع الي عملية التحوير الوراثي. المحاصيل المحمية ببكتريا Bt تحقق المواصفات القياسية لاوامر المنتج والتي وضعت لقليل من الاصناف النباتية. التقييم الخاص بصحة وعنفوان النبات ، خصائص النمو والانتاجية المحصولية والجودة والحساسية للامراض والحشرات اظهر ان النباتات المحمية ببكتريا باسيلليس متكافئة مورفولوجيا وزراعيا للنباتات الام.

لقد تم اجراء تحليل جزئي تفصيلي لكل محصول محمي ببكتريا Bt لتوصيف والتاكد من ان المادة الوراثية المطلوبة تم ادخالها. اكد التحليل اللاحق ان الكراي والعلامه البروتينات ادخلت فعلا كما تنبأ من التوصيف الجزئي. الكراي بروتينات ذات تاريخ طويل عن امان الاستخدام في منتجات الباسيلليس الميكروبية. لتاكيد امان الكراي بروتينات في المحاصيل المحمية ببكتريا Bt اجريت دراسات توكسيكولوجية علي الثدييات كما وصف قبلا. البروتين العلامه المختارة للنيومايسين فوسفوترانسفيريز II (II NPT) استخدم في القطن الباسيللي والبطاطس لتحقيق انتخاب الخلايا النادرة المطلوبة والتي تكتسب جين البكتريا Bt. جين npt II والبروتين المشفر ذات تاريخ في امان الاستخدام بناء علي وجود جين npt II والبروتين المشفر في المعدة وميكروبات التربة. امان بروتين NPT II تم

تقيـيمة فـي دراسـات السمية الحادة في الفئران عن طريق الفم ودراسات سلوك الهضم بالمقارنة مع الدراسات التي وصفت اعلاه مع الكراي بروتينات (Fuchs واخرون ١٩٩٣ أ ، ب). لـم تلاحظ اية تاثيرات معاكسة في دراسات السمية الحادة عن طريق الفم حتي ٥ ملـيون مـرة اعلي في المستوي عن الاستهلاك المتوقع. البروتينات العلامه تنهار بسرعة حيث وجدت نصف فترة حياه اقل من ٣٠ ثانية في دراسات محاكاه سلوك الهضم.

جـدول (٨-١١): مقارنـة الخصائص البيوكيميائية للكراي بروتينات والعلاقة المختارة والبروتينات المعروف عنها احداث الحساسية Allergenic proteins

الخصائص	المواد المحدثة للحساسية Allergens	بروتينات الكراي او العلاقة
البروتين وثيق الصلة في الغذاء	نعم	لا
الثبات مع الهضم	نعم	لا
الثبات مع عمليات التجهيز	نعم	لا

Source: Fuchs et al. (1993b); Sanders et al. (1998); Lavrik et al. (1995); Berberich et al. (1996).

بروتيـنات المعلـم المخـتارة NPT II والكراي بروتينات لم تظهر ايه تاثيرات حساسـة كبـيرة البروتينات المحدثة للحساسية الشائعة وجدت وثيقة الصلة بالغذاء وثابتة لظـروف الـتحلل البروتيني والحامضي لنظام الهضم كما انها ثابتة لظروف تجهيز الغذاء كما تكون جليكوسيلية. لم تتقاسم أي من الاقسام الثلاثة للكراي بروتينات ١ ، ٢ ، ٣ وكذلك البروتيـن العلامة المختارة NPT II أي من هذه الخصائص (جدول ٨-١١). أي من هذه المعايـير البيوكيميائـية وحدها لا تمكن من التنبؤ بالقدرة علي احداث حساسية البروتينات ولكن دمج هذه الصفات تقدم اساس قوي لاستنتاج ان هذه البروتينات ليست لها اية تاثيرات لاحداث الحساسية. نقص التقارير عن الحساسية للمستحضرات الميكروبية التجارية تعضد نقص التاثيرات الخاصة بالحساسية للكراي بروتينات. لقد تم تقييم المغذيات الهامة والمواد المضـادة للتغذية ANTINUTRIENTS بالتفصيل لكل المحاصيل ومقارنتها بالخطوط الابويـة وبما هو منشور في الدراسات المرجعية عن الاصناف النباتية. قائمة كل مكونات التحلـيل لهـذه المحاصـيل موضـحة في جدول (٨-١٢). النباتات التي اشتقت من هذه التحلـيلات اوضحت ان المحاصيل المحمية ببكتريا Bt (ذرة – قطن – بطاطس) متوافقة لحـد كبير في التركيب للخطوط الابوية (Sanders واخرون ١٩٩٨ ، Lavrik واخرون ١٩٩٥ .....). خلاصة القول ان البيانات التي تحصل عن امان الكراي والعلامة بروتينات

والتركيـــب تؤكـــد علي امان الغذاء والاعلاف المشتقة من المحاصيل البكتيرية Bt والتي حصلت علي الموافقة الكاملة للتسويق.

جـــدول (٨-١٢): القائمـــة الموصي بها للمواد المغذية الفاتحة ومضادات التغذية لوضع التكافؤ الكبير في المحاصيل الموضحة.

المكون	ذرة	قطن	بطاطس
البروتين	√	√	√
الدهن	√	√	
النشا (كربوهيدرات)*	√		
الكثافة النوعية (مواد صلبة)			√
الالياف الخام			√
الياف المادة المنظفة الحامضية	√	√	√
الياف المادة المنفة المتعارطة	√	√	
الاحماض الامينية الفردية	√		
الاحماض الدهنية الاساسية	√	√	
الجو سيبول		√	
المعادن	√	√	√
الفيتامينات	√	√	√
الجليكو الكاليوز		√	√
احماض دهنية جليكوبروبينويوز		√	
الميكوتوكسينات	√	√	

**في التقاوي والحبوب والدرنات او الثمار*

التاثيرات البيئية Environmental implications

التاثيرات البيئية للكراي بروتينات Environmental impact

لقـــد خلصـــت وكالة حماية البيئة الامريكية USEPA الي "مخاطر السمية وعدوي بســـبب تاثـــيرات الدلـــتا-اندوتوكسينات علي الطيور غير المستهدفة واسماك المياه العذبة واللافقاريـــات والمحـــارات والحيوانات الحرية ومفصليات الارجل من مفترسات/طفيليات ونحـــل العسل والقراء والحيوانات الثديية تتراوح من اقل ما يمكن minimal وحتي عدم الوجود عند معدلات الاستخدام الموصي بها والموضحة علي البطاقات الاستدلالية لتسجيل بكـــتريا الباسيلليس ثورينجنسيز من المواد الفعالة (EPA ١٩٩٨ – أ). هذا يقدم دليل قوي ان الكراي بروتينات في النباتات المهندسة بالباسيلليس Bt والتي ووفق علي تسويقها تملك

مخاطـــر قلـــيلة علي الكائنات غير المستهدفة. مستوي التعرض للكراي بروتين في نباتات البكـــتريا Bt قليلة لحد كبير عما هو الحال مع التعرض من استخدام المنتجات الميكروبية الباسيللية Bt مع المعدلات الموجودة علي البطاقات الارشادية. بسبب ان الكراي بروتينات تـــنهار بســـرعة كما انها تنتج بصفة مستمرة في النباتات الباسيللية فان دوام التعرض في البيئة سيكون طويلا مع النباتات البكتيرية بالمقارنة بمنتجات Bt الميكروبية.

الكـــراي بروتيـــنات المعبر عنها والتي حظيت بالموافقة الكاملة في منتجات Bt في امريكا اظهرت قليل او عدم تاثير علي الطيور والاسماك واللافقاريات المائية ومدي واسع مـــن الحشـــرات النافعة (جدول ٨-١٣). اجريت دراسات تم فيها معاملة الكراي بروتين المنقـــي الذي ينتج في النظم الميكروبية لتوصيف الصفات التوكسيكولوجية لهذه البروتينات علـــي الكائـــنات غير المستهدفة. كذلك تمت تغذية الحيوانات بطريقة قريب الشبة ويحاكي التعرض الطبيعي للبروتين علي الحبوب اللقاح وانسجة الورقة من مختلف المنتجات النباتية المحمـــية بباســـيلليس Bt. بوجة عام اتضح عدم حدوث موت او اية تاثيرات سلوكية علي الحـــيوانات غـــير المســـتهدفة التي تغذت علي الكراي بروتين بكميات تزيد عن التعرض الطبيعـــي عشـــرة امثال علي الاقل وعادة اكثر من ١٠٠ مثل في جميع الحالات لم تسجل حالـــة واحـــدة ظهر فيها تاثيرات معاكسة عند مستويات الكراي بروتينات التي تقارب ما يحدث تحت الظروف العادية. بوجة عام تم توصيف الكراي بروتينات علي انها غير سامة علي الكائنات غير المستهدفة (EPA ١٩٩٦-جـــ).

عـــدم احداث فاعلية او نشاط الكراي بروتينات ضد الكائنات غير المستهدفة لا يثير الدهشـــة من منطلق التخصص الشديد للهدف. هذا لدرجة ان مفترسات ابو العيد النافعة لا تـــتاثر بالبروتيـــنات cry3Aa بالرغم من فاعليتها الشديدة علي خنفساء كلورادو البطاطس (Dogan واخـــرون ١٩٩٦). بســـبب ان العديد من الكراي بروتينات لا تتاثر ضد افات حشرات حرشفية الاجنحة (ابي دقيقات والفراشات) الا انه قد يكون لها فاعلية ضد حشرات بخلاف حرشفية الاجنحة ، هذا ولو ان النباتات البكتيرية Bt عادة ما يكون لها خطر قليلة للغايـــة علـــي هـــذه الانـــواع غير المستهدفة لاسباب عديدة. السبب الاول انه علي غرار الكائـــنات غـــير المســـتهدفة فـــان حرشفيات الاجنحة النافعة قد لا تكون حساسة للكراي بروتيـــنات. اذا كانـــت الكائـــنات غير المستهدفة حساسة يكون ذلك قاصرا علي الاطوار الاولـــي القلـــيلة فقط. مثال ذلك ان الحشرات الكاملة حتي المستهدفة تظهر نقص كبير في الحساســـية. لقـــد وجـــد Halcomb واخرون (١٩٩٦) ان العمر الخامس من دودة براعم

الدخان ودودة اللوز قليلة الحساسية بشكل كبير للكراي cry1Ac عن الاطوار المبكرة لهذه الحشـــرات. السبب الثاني يتمثل في ان درجة التعرض للكراي بروتين في النباتات المحمية ببكـــتريا Bt محـــدودة للغاية الا اذا كانت الحشرات تتغذي مباشرة علي النباتات او اجزاء مـــنه. الديدان التي تتغذي علي النباتات البكتيرية سوف تتعرض ولكنها ينظر اليها كأفات. ابـــي دقـــيقات البالغة والفراشات قد تزور ازهار المحاصيل البكتيرية للتغذية علي الرحيق ولكـــن القلـــيل او لا يوجـــد كراي بروتين في الرحيق وفي أي الاحوال فان طور الحشرة الكاملة في حرشفية الاجنحة ليست حساسة للكراي بروتين.

جدول (٨-١٣): سمية الكراي بروتينات للكائنات غير المستهدفة.

الكائنات غير المستهدفة	نتائج الاختبارات		
	Cry3A (بطاطس)	Cry1Ac (قطن-ذرة)	Cry1Ab (ذرة)
خنافس ابي العيد	غير سامة عمليا	غير سامة عمليا	غير سامة NOEC>20
الكولمبولا	NOEC>200 ppm	NOEC>200 ppm	NOEC>200 ppm
نحل العسل	غير سامة علي اليرقات	غير سامة عمليا	غير سامة NOEC>200 ppm
دودة الارض	–	–	غير سامة NOEC>20 ppm
الدبابير الطفيلية	غير سامة عمليا	غير سامة عمليا	غير سامة NOEC>20 ppm
البق الاخضر	غير سامة	غير سامة	غير سامة NOEC>16.7 ppm
العصفور الابيض	غير سامة ج ق = اكثر من ٥٠٠٠٠ جزء في المليون	غير سامة عمليا	NOEC>100000 ppm
دافنيا	لا تطبق عليها NA	لا تطبق عليها NA	غير سامة NOEC>100 ppm
سمك	لا تطبق عليها NA	–	عديمة التاثير

NOEC = التركيز عديم التاثير الملحوظ   NA= not applicable

الـــتغذية غير المتعمدة ليرقات الحشرات علي حبوب اللقاح المنتثرة بالرياح قد تحقق فرصـــة كبـــيرة للتعرض للكراي بروتين للحشرات حرشفية الاجنحة غير المستهدفة (ابي دقـــيق). هـــذا الوضـــع يخلق خطر او ضرر محسوس في حالة ما اذا كانت كل الظروف الفراغية والمؤقتة والحيوية الاتية متوفرة:

١- يجب ان تكون حبوب اللقاح محتوية علي بعض من الكراي بروتين
٢- يجب ان تنتشر كميات كافية من الكراي في حبوب اللقاح علي النباتات وتظل عليها والتي تتغذي عليها حشرات حرشفية الاجنحة غير المستهدفة
٣- يجب ان تكون حشرات حرشفية الاجنحة حساسة للكراي بروتين
٤- يجب ان يحدث تساقط لحبوب اللقاح عندما تكون اليرقات في الاعمار الاولى الحساسة للكراي بروتينات
٥- يجـب ان تقوم اليرقات بتناول وهضم حبوب الكراي مع حبوب اللقاح بكميات كافية لتغير التطور الطبيعي لليرقات.

هـذه الظروف قد توجد بشكل محدود كلي وجزئي مع جزء من مجموع الحشرات. كذلـك لا توجد ادلة تشير الي ان هذه الظروف تحدث بتكرارية تؤدي لحدوث أي معنوية علـي مجمـوع ابي دقيق (Sears واخرون ١٩٩٩). لقد اجريت دراسات استهدفت القاء الضـوء عن كمية حبوب اللقاح من الذرة المهندس وراثيا ببكتريا Bt والتي تتساقط وكذلك مسافة وقوعها وتاثير ذلك علي درجة تعرض ابي دقيق. لقد خلص الباحثون في الدراسات المعملـية ان نمـو وتطور ابي دقيق لم يتأثر عندما تغذت اليرقات واستهدفت نسيج ورقة حشيشـة اللبـن المعاملـة بمعدل ١٥٠ حبة لقاح/سم٢ من حبوب لقاح الذرة البكتيري. لقد خلـص الباحث Dively واخرون (٢٠٠٠) ان ٨% فقط من الاوراق داخل وعلي حواف حقـول الـذرة و ٢% فقط من الاوراق علي بعد ١-٥ متر من الحقل تحقق رواسب من حـبوب اللقـاح اكبر من ١٥٠ حبة/سم٢. مرة اخري تاكد البحاث من العلاقة بين تركيز حـبوب اللقاح ودرجة التعرض لاحداث اية اضرار علي ابي دقيقات وهذا اساس يؤخذ في تجارب تقويم المخاطر.

التاثيرات البيئية للنباتات المهندسة وراثيا ببكتريا الباسيلليس Bt

بسـبب ان الكـراي بروتيـنات ذات تاثـير قليل او عديمة التاثير علي الفقاريات واللافقاريات بما فيها مدي واسع من الحشرات النافعة والمجموع غير المستهدفة فانه يتوقع زيـادة تعدادها بسبب ادخال المحاصيل الباسيللية والتي تقلل من استخدام المبيدات الحشرية واسعة التاثيرات. زيادة المجموع هذه يؤدي الي زيادة شاملة في التنوع الحيوي داخل النظم الزراعـية وكذلـك تقلل من احداث خلل في عدد العمليات الايكولوجية جين المؤثرة. كما نوقش قبلا فان مجاميع الحشرات غير المستهدفة يتوقع ان تزيد مع خفض استخدام المبيدات الحشرية واسعة التاثير. لقد تاكد هذا الوضع مع نباتات القطن والبطاطس المهندسة وراثيا.

زيـــادة المجموع في الحشرات النافعة يسمح للمكافحة الحيوية ان تلعب دورا كبيرا ومؤثرا في تنظيم والسيطرة علي انواع الافات الاولية والثانوية. التاثير علي العمليات الحيوية التي تحـــدث فـــي الـــتربة تتاثر وتقل بدرجة كبيرة كذلك مع زراعة النباتات الباسيللية بدلا من الاعـــتماد علـــي المبـــيدات مما لا يؤثر علي اللافقاريات التي تسكن التربة قبل الكولمبولا وديدان الارض. لقد لوحظ كذلك زيادة الطيور في الحقول المزروعة بالمحاصيل المهندسة وراثـــيا. ليكـــن في الحسبان ان الكراي بروتينات تدخل التربة من خلال دفن النباتات في الـــتربة وقد ثبت ان هذه الكراي بروتينات تنهار بسرعة في التربة بمعدلات مقارنة لمعدل اختـــيار الكـــراي بروتيـــنات في منتجات بكتريا Bt (Palm واخرون ١٩٩٣ ، ١٩٩٤ ، ١٩٩٦ ....). بـــناء علـــي المعلومـــات التـــي ذكرت قبلا فان التخصص الشديد للكراي بروتيـــنات والانهيار السريع في الارض تقدم دليل قوي علي ان الكراي بروتينات في بقايا النباتات من المحاصيل المهندسة ببكتريا Bt لا تسبب اية مخاطر علي البيئة.

النشـــر العـــريض في زراعة النباتات البكتيرية Bt يثير بعض الاسئلة عن امكانية انســـياب او نشر جينات الكراي لانواع النباتات البرية وتطور مقاومة الافات لفعل الكراي بروتينات. هذا التساؤل يؤخذ في الاعتبار قبل هندسة البطاطس والذرة والقطن البكتيري في كل من امريكا وكندا والمكسيك والارجنتين وغيرها من البلدان والتي تم قبول هذه النباتات فـــيها او هـــي فـــي سبيل القبول. بالنظر الي انسياب الجين والنواحي التقسيمية والوراثية وطـــريقة التكاثر والقدرة العبورية في محاصيل القطن والذرة والبطاطس فانة تم استيضاح ووضع النقاط التالية: ١- عدم مقدرة جينات الكراي المزروعة في الاصناف التجارية لهذه المحاصـــيل علي العبور الي الانواع البرية ، ٢- اذا حدث انسياب للجين فان التاثير يجب ان يقيم. لم تثبت باي دليل حدوث عبور في الذرة في امريكا بسبب عدم وجود اقارب للذرة في امريكا بينما تم تقييم حدوث هذا العبور في المكسيك بسبب وجود عوائل اخري تتوافق مـــع الـــذرة. بالنسبة للبطاطس فان الصنف التجاري المهندس وراثيا واسع الانتشار وهو Russet Burbaork وهـــو ذكري عقيم ومن ثم يكون من المستحيل نشر وانسياب الجين. بالاضـــافة الي ذلك فان البطاطس ليست متوافقة جنسيا مع أي نوع نباتي قريب في امريكا الشمالية لذلك لا يكون هناك أي احتمال لحدوث العبور. بالنسبة للقطن هناك نوعان بريان فقـــط فـــي امريكا وهما G.thurberi في اريزونا و G.tomentosum في هاواي وهما يمكـــنا من احتمالات حدوث العبور مع اصناف القطن التجارية. القطن المزروع من النوع allotetraploid بيـــنما الصـــنف G.thurberi من النوع diploid وهذا يعني انهما غير مـــتوافقان ومـــن ثـــم لا يمكن ان ينجبانسل خصب. كذلك فان الصنف .G.t غير متوافق

مورفولوجــيا مــع الاصـــناف الــتجارية لذلك لا يوجد خوف من احتمال حدوث التهجين العــبوري فـــي القطن في امريكا. مع هذا فانه مع محاولات الحصول علي نباتات مهندسة وراثيا يجب اخذ عملية التهجين العبوري في الاعتبار.

مجاميع الافات التي تتعرض للنباتات المهندسة وراثيا عندها مقدرة لتكوين سلالات مقاومة للكراي بروتينات ولو ان المقاومة ليست متماثلة مع كل المحاصيل. تجدر الاشارة الي انه من بين اهم اسباب محاولات وادخال النباتات المهندسة وراثيا ببكتريا BT ما حدث مـــن خفــض في كفاءة المبيدات الحشرية من مجموعة البيرثريودز المخلقة بسبب ظهور مقاومـــة الحشـــرات لفعلهـــا. لذلك تم وضع خطط طويلة المدي لمنع تطور المقاومة في النباتات البكتيرية.

Reference

Amer, C., Berry, A. R. E., and Kogan, M. (1999). Effects ofphtyopha-gous Heteropteran predators of feeding on transgenic Bt potato plants. Submitted for publication.

Astwood, J-D., Leach, J. N,, and Fuchs, R, L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. Natum Bio/Tcchnol. 14, 1269-1273.

Barbera, P. W. (1995). Toxicity/Pathogenicity Testing of Bacillus thuringiensis Strain EG 7826 Following Acute Oral Challenge in Rates, IITRI Project No. L08574, ITT Research Institute, Chicago, IL.

Baum, J. A., Johnson, T. B., and Carlton, B, C, (1999). Bacillus thuringiensis natural and recombinant bioinsecticide products, Tn Methods in Biotechnology. Vol 5. Biopcsticidcs: Use and Delivery (F. R. Hall and J. J. Mean, Eds.), pp. 189-209. Humana Press, Inc., Totowa, NJ,

Berberich. S, A,, Ream, J. E., Jackson, T, L.. Wood, R., Stipanovk, R,, Harvey. P., Patzcr, S., and Fuchs, R- L. (1996). Safety assessment of insect-protected cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to conventional cottonseed, J. Agric. Food Chem. 41, 365-371,

Carter, J. N., Baker, M, N,, and Denton, S. M. (1993). Acute Oral Toxicity and InfKCtivity/Pathogcnicity to Rats of EG7673. HRC Study Report No- ECO 1/930923. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.

Carter. J. N., and Liggett, M. P, (1994). Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of EG 7841, HRC Study Report No. ECO 6/942538. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.

Crickmore, N,, Ziegler, D, R,, Feitelson, J., Schnepf, F-., Van Rie, J., Lereclue, R., Baum, J., and Dean, D, II, (1998). Revision of the nomenclature for ihe Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807-813.

Culpepper, A. S.i and York, A, C, (1998). Weed management in glyphosate-tulerant cotton. J. Cotton Sci. 4. 174-185,

David, R. M. (1998). Acute Oral Toxicity/Pathogenicity Study in the Rat. Unpublished study prepared for Ecogen, Inc. EPA MRTD No. 409511-02.

Dively, G., Foster, J. E,, dark, T, L., ynd Jones, G. D- (2000). Deposition of Corn Pollen on Miikwcrd Plants in Maryland and Nebraska. Presented at. 1-he Monarch Butterfly Research Symposium, Chicago, IL, Nov. 2, 1999, Agricultural Biotechnology Stewardship Working Group.

Dogan, E, B,, Berry, R. E,, Reed, G- L., and Rossignol, P. A. (1996). Biological parameters of convergent lady beetle (Coleroptera; Coc-cinellidac) feeding on aphids (Homoptera; Aphidadae) on transgenic potato. J. Econ. Entomol. 89, 1105-1108.

English, L., and Statin, S. L. (1992). Mode of action of delta-endo-toxin from BaciHu', tliuringiensis: A comparison with other bacterial toxins. Insect Biochem. Mol. Biol. 22. 1-7.

EPA (1986), EPA Fact Sheet for Baa//us Ihuringicnsis Subspecies kurstaki, israelensis, and aizawai, September 1986 (Abbott).

EPA (1988). EPA Guidance for the Re-registration of Pesticide Products Containing Bacillus thuringiensis as the Active Ingredient. Re registration Standard 540; RS-89-023,

EPA (1991). EPA Fact Sheet for Delta Endotoxin ofBacillus thuiin-giensis variety San Diego Encapsulated in Killed Ps fJuorescens, June 27, 1991 (Mycugen Corporation).

EPA (1995a). EPA Fact Sheet for Bacillus thuringjensjs Sulwpr.cicf, kurstaki Cry] A (b) Delta Endutoxin and Its Controlling Sequences in Corn, March 21, 1995 (Ciha Seeds).

EPA (1995b). EPA Fact Sheet for Bacillus thuringiensis Subspecies tcncbrionis Cry3A Delta Endotoxin and Its Controlling Sec/ufni: in Potato, May 5, 1995 (Monsanto),

Munkvold. G. P., Hellmich, R. L,. and Rice, L. R. (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic bt maize hybrids and nonlransgenic hybrid[1].. Plant Dis. 83, 130-138,

Norred, W. P. (1993). Fumonisins-mycotoxins produced. J. Toxiwi. Environ. Health 38, 309-328.

Noteborn, H, P. J, M., Rienenniann-Plouiri, M, E., van den Berg, J. H. J., Alink, G. M,, Zolla, L., and Kuiper, H, A. (1993). Food safety of transgenic tomatoes expressing the insecticidal crystal protein CrylAb from Bacillus thuringiensis and the marker en- zyme APH(3')IT. Med. Fac. Landhouww. Univ. Cent. 58/4b,

Noteborn, H. P. J, M., Rienenmann-Ploum, M, E.. van den Berg, J, H, J., Alink, G. M., Zolla, L.., and Kuiper, H. A. (1994), Consum- ing transgenic food crops: The lexicological and safety aspects of tomato expressing CrylAb and NPT1I. In ECB6: Procc-ding of [he 6th European Congress on Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.

Palm, C. J., Seidlcr, R. J,, Donegan, K. K., and Harris, D. (1993), Transgenic plant pesticides: Fate and persistence in soil. Plant Physio!. Suppi 102, 166.

Palm, C. J., Donegan, K. K., Harris, D., and Seidler, R. J, (1994). Quantitation in soil of Bacillus thuringiensis var. kurstciki delta- endotoxin From transgenic plants. Mol. Eco!. 3, 145-151.

Palm, C. J., Schaller, D. L., Donegan, K. K., and Seidler, R. J. (1996). Persistence in soil of transgenic plant produced Bacillus thurin- giensisvar. /((//sraA/delta-endotuxin- Can. J. Microbiol. 42, 1258- 1262.

Perlak, F, j., Deaton, R, W,, Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J, T,, and Fischhoff, D, A. (1990), Insect resis- Lant cotton plants, Bw/Technology 8, 939-943.

Perlak, F, J., Fnchs, R. L., Dean. D. A,, McPherson, S. L., and Fischhoff, D, A, (1991). Modification of the coding sequence en- hances plant expression of insect cotton protein genes, PNAS 88, 3324-3328.

Perlak, F. J., Stone. T. B.. Muskopf, Y, M., Petersen, L. J,, Parker, G. B,, McPherson, S. A,, Wyman. J,, Love, S,, Reed, G., Biever, D., and Fischhoff, D. A. (1993). Genetically

improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Mol. Bio!. 22, 313-321,
Pleasants, J. M., Hellmich, R, L.. and Lewis, L. C. (1999). Pollen Deposition on Milkweed Leaves under Natural Conditions and Assessment of Risk to Monarch Butterfly Larvae from Bt Pollen. Presented at the Monarch Butterfly Research Symposium, Chi- cago, 1L, Nov. 2, 1999. Agricultural Biotechnology Stewardship Working Group,
Ream. J. E., Berberich, S. A., Sims, S, R,, Rogan, G. J., and Fuchs, R, L. (1992). In phinta distribution and environmental fate ol insect resistant proteins. Plant Physiol. Suppl. 99, 80.
Reed, G. L., Puls, K., Jensen, A, S., Feldman, j., and Berry, R. E (1993). The effect, of Colorado potato beetle control measures 01 non-target arthropods. In Proceedings of the 1993 Washingtoi State Potato Conference and Trade Fair, pp. 125-140.
Rice, M, (1998). Grower Surveys. Iowa State University, Sanders, P, R., Lee, T. C,. Groth, M. E., Astwood, J, D,, and Fuch[1] R. L. (1998), Safety assessment of the insect-protected corn. 1 Biotechnology and Safety Assessment (J. A. Thomas, Ed.), 2nd ed pp. 241 -256, Taylor & Francis, London,
Saxena, D,, Flores, S., and Stotzky. G, (1999). Transgenic plant Insecticidal toxin in rool exudates from Bt corn. Nature 402, 48' Schnepf, H. E., and White ley, H. R. (1981). Cloning and expression the Bacillus thuringiensis crystal protein gene in Escnerichia co Pruc. Nat!. Acad. Sci. USA 78, 2893-2897.
Sears, M, K., Stanley-Horn, D. E., and Mattila, H. R. (1999). Prelii mary Report Investigating the Ecological Impact ofBt Corn Poll on Populations of Non-target Lepidopterd Including the Monarcn Butterfly in Ontario. Report, submitted to the Canadian Food In- spection Agency, Guelph, Ontario.
Sears. M, K., and Stanley-Horn, D. (2000), Impact of Brcorn pollen on monarch butterfly populations. In Proceedings from the 6th International Symposium on The Safety of Genetically Modified Organisms (C. Fairbairn, G. Scules, and A. McHughen, Eds.). Univ. Extension Press, Univ. of Saskatchewan, SK, Canada, Sims, S. R., and Holden, I-.. R, (1996). Insect bioassayfor determining soil degradation of Bacillus thunngiensis subsp. Kurstciks [CrylAb)] protein in corn tissues. Environ. Entomol. 25, 659-664.
Sims, S, R., and Martin, J. W. (1997), Effect of Bacillus thuringicnsis insecticidal proteins CryIA(b), CryIA(c), Ci-yIIA, CryIIIA on Fol- somia Candida and Xenylla gnsea (Insecta: Collcmbola). Pedobio- !ogiri4l, 412-416, Sjoblad. R. D., McClintock. J. T., and Engler, R. (1992). Lexicological considerations for protein components of biological pesticide prod- ucts- J. Econ. Entomol. 80. 717-723.
Smith, R. H. (1997). An extension entomologist's 1996 observations of Bollgard Bt technology. In !997 Proceedings Beltwide Cotton Conferences.
Smith, R. H, (1999). Alabama entomologist believes genetic engi- neering and eradication will usher in a new era of cotton pests. Cotton Grower Plus March 1999.
Spencer, T, M., Orozco, E. M., and Doyle, R, M. (1996), Petition for Determination of Non-regulated Status: Insect Protected Corn (Zea mays L.) \vitn crylAc Gene from Bacillus rhuringiensis subsp. kurstaki. DEKALB Genetics Corporation, October 14, 1986,
Stephens, S. G. (1964), Native Hawaiian Cotton [Gossypium tomeri- rwumNatt,). Pau. Sd. 18, 385-398, Taylor. S, L., and Lehrer, S. B. (1996). Principles and characteristics of food allergens. Crit. Rev. Food Scj. Nutr. 36(S), S91-S118.
Thompson, M. A., Schnepf, H. E., and Feitelson, J. S. (1995), Struc- ture, function and engineering of Bacillus thuringjmsis toxins. Genet. Eng. 17, 99-117.
USDA (1975), Cooperative Economic Insect Report. APHIS 25, 32,

USDA Technical Assessment Systems (1993). Exposure 1, Chronic Dietary Exposure Analysis Program (1987-88 or 1977-78 USDA Surveys). Technical Assessment Systems, Inc., Washington, DC.
USDA (1998). Pest Management Practices: 1997 Summary. National Agricultural Statistics Service. SPCRI (98).
Vaeck, M., Reybnaerts, A., Hofte, J., Jansens, S., DeBeuckeleer, M,, Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1987), Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328, 33- 37.
Weinzieri, R., Pierce, C,, and Steffey, K. (1997). Preliminary results of 1997 summer survey for Br-resistant European corn borers. Pet Manage. Crop Dev. BuSl. 22. 183-184.
WHO (World Health Organization) (1998). GEMS/FOOD RE- GIONAL DIETS. Food Safety Unit, Programme of Food Safety and Food Aid. WHO/FSF/FOS/98,3 WHO.
Williams, M, R. (1997). Cottun insect losses 1979-1996. In 1997 Proceedings Bcltwide Cotton Conferences.
Williams, M. R, (1999). Cotton Crop Losses. Retrieved June 1999 from the World Wide Web: http://www.msstate.edu/Entomology/ CTNLOSS/1998loss.html.
Xia. J. Y.. Cut. J. J., Ma, L. H., Dong, S. X., and Cui, X, F. (1999). The role of transgenic Bt cotton in integrated insect pest management. Ada Gossypsi Sim. 11, 57-64.
EPA (1995c). EPA Fact Sheet for Bacillus thuringiensis Subspecies kurstaki Cry1Ac Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences as Expressed in Cotton, October 1995 (Monsanto),
EPA (1996a). EPA Fact Sheet for Bacillus thuringSensi-s Subspecies kurstaki Strain EG 7841, September 1996 (Ecogen).
EPA (1996h). EPA Pact Sheet for Bacillus thuringiensis Subspecies kurstuki CrylAfbj Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences as Expressed in Corn. December 20, 1996 (Monsanto).
EPA (1997). EPA Fad Sheet For Bacillus thuringiensis Subspecies kurstaki Cryl A (c) Delta Endotoxin and the Genetic Material Nec- essary for Its Production in Corn, March 1997 (DeKatb Genetics).
EPA (1998a). EPA registration eligibility Decision (RED) Bacillus thuringiensis. EPA 738-R-98-004, March 1998.
EPA (1998b). (RED Facts) Bacillus thuringiensis, EPA-738-F-98- 001, Falck-Zepeda, J. B,, Trailer, G., and Nelson, R. G. (1999). Rent Creation and Distribution from Biotechnology Innovations: 'The Case' of Bt Cotton and Herbicide-Tolerant Soybeans in 1997. ISAAA Briefs No. 14, ISAAA, Ithaca, NY,
Federal Register. Bacillus thuringiensis Cry)A(b) delta, endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from requirement of a tolerance; Final Rule; 61 FR 40340. August 2,1996.
Feldman, J,, Reed, G, L.. Wyman, J. A., Stewart, J., and Stone, T. B. (1992). Genetically Modified Colorado Potato Beetle Resistant Po- tato Plants, Foliar-Applied Mic.robial Bt and Conventional Insec- ticides: Comparative Impacts on Non-target Arthropods, Appendix I, NewLeaf Public Interest Document, EPA. Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S,, Perlak, F. J., Man-one. P, G., McCormick, S. M,, Nidermeyer, J, G.. Dean, D, A., Kusano- Kretzmer, K,, Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S, G,, and Fraley, R, T, (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technology5, 807-813.
Fisher, R., and Rusner, L, (1959). Toxicology of the microbial insec- ticide, Thuricide, Agric. Food Chem. 7, 686-688.
Fryxell, P. A, (1979). The Natural History of the Cotton Tribe (Mal- vaaceae, Tribe Gossypiese). Texas A&M Univ. Press, College Sta- Lion, TX,

الفصل الثالث

النباتات المهندسة وراثيا بشكل عام في كندا وأمريكا

أولا: تشريعات الأمان الحيوي:

مقدمـــة: لقــد تقدمت طرق ووسائل الهندسة الوراثية للدرجة التي مكنت من توفير المنتجات الناتجة من دمج وهندسة الكائنات الحية للمستهلكين. إذا قصرنا الكلام بشيء من التخصـــص علـــى النـــباتات يمكـــن القول أن كل المحاصيل الزراعية الهامة تقريبا قد تم هندســـتها فى اتجاه صنف لتحسين واحد أو أكثر مقاومة للآفات (Gasser and Fraley، ١٩٨٩). المحاصـــيل الـــتى تنـــتج نوعية أفضل من الغذاء أكثر مقاومة للآفات والإجهاد والضـــغوط البيئية وتهندس كي تتحمل الأضرار السيئة التى تحدثها مبيدات الحشائش. هذه المنـــتجات ذات أهمـــية واقعية بشكل كبير فى تحقيق الفوائد لمصنعى الغذاء والمستهلكين والـــزراعة بوجـــه عام. هذه المنتجات ستكون أكثر تكلفة لإنتاجها وتصنيعها كذلك ستكون ذات قيمة غذائية عالية وسوف تحقق مرونة أكثر للفلاحين فى العمليات الزراعية المؤثرة. نظـــرة مستقبلية عن هذا الاقتراب توضح أن النباتات قد تستخدم لإنتاج كميات كبيرة من الببتـــيدات المفـــيدة العلاجـــية وكذلك الدواء الكيميائى النادر مثل التاكسول بأسعار زهيدة. صناعة التكنولوجيا الحيوية فى النباتات وصلت الآن الى نقطة أصبحت عندها الاختبارات الحقلية للنباتات المحورة وراثيا (GMPs) محل تقدير على أنها خطوة عقلانية وحرجة فى تقيـــيم الأمـــان والاقتدار التجارى والتأثيرات البيئية لكل منتج. يمكن القول أنه قد أجريت مئات من الاختبارات الحقلية على مستوى العالم دون أية حوادث عارضة وتم إعداد تقارير علمـــية عـــنها (Ginzburg، ١٩٩١، المركـــز القومي للبحوث، ١٩٨٩، Halvorion وآخـــرون، ١٩٨٥) وغيرها. الوصول لهذه المرحلة فى العملية التجارية يتطلب العمل مع الهيـــئات الحكومـــية الـــتى تملك السلطة للموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية للنباتات المحـــورة وراثيا. إن طلب الحصول على موافقة السلطات المعنية لنشر النباتات المحورة علـــى المستوى الحقلى يتطلب تقديم كافة البيانات والمعلومات عن الكائن وطريقة التحويل والجيـــن وأصله والمنتجات المعبر عنها ونواتج التعبير وتأثيراتها على البيئة. هذه البيانات تتأتى من الدراسات تحت الظروف المتحكم فيها مثل الصوب الزجاجية وحجر النمو.

النواحي التشريعية Regulatory aspects

استعراض ونظرة عامة

لقد قام مربى النباتات بالتحوير الوراثى للنباتات على امتداد قرون لتحسين الصفات الزراعية للمحاصيل ونباتات الزينة. فى كندا وأوربا توجد طلبات للموافقة لكل الأصناف النباتية الجديدة بينما فى أمريكا لا توجد هذه المتطلبات. إن الاهتمام الزائد باستخدامات وكفاءة وإمكانيات اقترابات الهندسة الوراثية فى تحسين النباتات تطلبت اشتراك العديد من المكاتب والهيئات الحكومية فى عملية ودور التشريعات. فى كندا وأمريكا وأوربا واليابان تكون بعض الهيئات والوكالات التى تنظم الصناعات الزراعية والغذائية تحت مظلة القوانين القومية مسئولة عن نشر النباتات GMPs فى البيئة. مع مساعدة الخبراء الأكاديميين ورجالات الصناعة ومجموعة الخبراء العالميين وكذلك منظمة تطوير التعاون الاقتصادى (OECD) والدلائل تم تطويرها لتنظيم تسجيل والتعامل مع GMPs.

التشريعات فى كندا

الحكومة الكندية تعضد بقوة تطوير التكنولوجيا الحيوية فى كندا كوسائل ومداخل لتقوية التنافس الاقتصادى . التشريعات الكندية والنظرة الشاملة للتعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs تقسم بين ثلاثة وكالات . وزارة الزراعة الكندية التى تنظم المنتجات الزراعية الناتجة من التكنولوجيا الحيوية بما فيها الأعلاف الحيوانية والأسمدة والمبيدات والتقاوى والمواد البيولوجية البيطرية . تقدم هذه التشريعات نظام للتفتيش للتأكد من الجودة والأمان ونقاوة الأغذية . تتطلب الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs فى كندا موافقة وتصريح من وزارة الزراعة الكندية وهى المسئولة عن تقييم الأمان البيئى للتجارب الحقلية تحت دلائل عملية التقييم البيئى والمراجعة . وزارة الصحة الكندية تنظم وتشرع وتراقب الأغذية ومضافات الغذاء والكيميائيات وغيرها من المنتجات التى قد تؤثر على القيمة الغذائية للأطعمة . وزارة البيئة الكندية تنصح وزارة الزراعة الكندية عن النواحى البيئية وزيادة تحسين جودة البيئة الكندية .

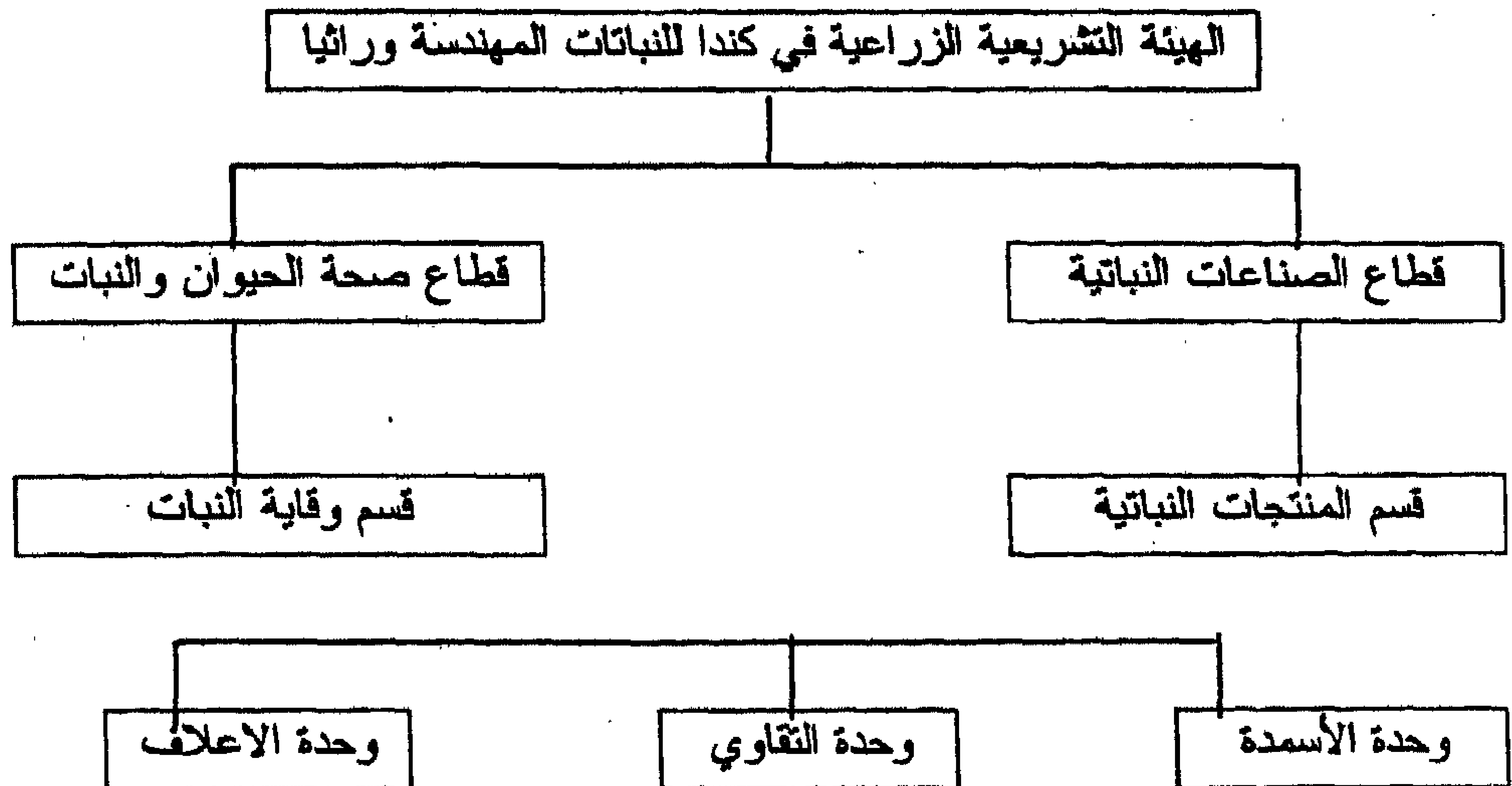
وزارة الزراعة الكندية هى الوكالة القيادية عندما تأخذ فى الاعتبار النواحى التشريعية لاستخدام النباتات المحورة وراثيا فى الحقل (الشكل ٨-١) . لقد طورت اقتراب مرن لتنظيم التعامل مع حزمة القوانين الموجودة . يبنى اقتراب الوزارة على تقييم كل مركب على حدة وتقييم كل حالة بحالتها Case-by-case مع التقييم العلمى للمخاطر المرتبطة بالنشر الحقلى لهذه النباتات المهندسة وراثيا . بناء على هذه المخاطر يتبع نظام

ذو أربعة مراحل للتشريع . استخدام الصوب الزجاجية والمعامل (مرحلة -١) تعتبر ذات خطر أقل ومن ثم لا تتطلب تشريعات . التجارب الخاصة بالبحوث فى نطاق محكم (المرحلة -٢) تعنى مخاطر متزايدة تتطلب تشريعات أما التجارب غير المحكمة لأغراض البحث (المرحلة -٣) والنشر التجارى (المرحلة -٤) كلها تتطلب تشريعات بسبب المخاطر المحتملة منها . منذ عام ١٩٨٨ أجريت ما يزيد عن ٣٠٠ تجربة حقلية فى المرحلة الثانية مع القليل من تجارب المرحلة الثالثة.

الجدول (٨-٣) يلخص أنواع التجارب الحقلية التى ووفق عليها عام ١٩٩٢ وأجريت فى ١٨ موقع عبر كندا .

جدول (٨-١٤): ملخص للتجارب الحقلية التى تمت الموافقة عليها عام ١٩٩٢ في كندا

نوع المحصول	عدد التجارب	نوع التجارب	عدد التجارب
البرسيم	٢	تحمل مبيد الحشائش	١٨٥
الكانولا	١٦٤	تحمل الإجهاد	٢
الكتان	٢٤	المقاومة للفيروسات	٨
البطاطس	١٠	المقاومة للحشرات	٤
فول الصويا	١	زيادة الزيت	١
الدخان	٢	زيادة البروتين	١



شكل (٨-١): الهيكل التنظيمى المسئول عن النباتات المهندسة وراثيا GMPs فى وزارة الزراعة الكندية .

مسئول تقييم المنتجات النباتية في وزارة الزراعة الكندية له كل مسئوليات وصلاحيات الموافقة على التجارب الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs تحت قانون التقاوى وقانون وقاية النبات والتشريعات منذ عام ١٩٨٧ . بالإضافة الى ذلك فان قطاع الصناعة النباتية ممثلاً في قطاع المبيدات قبل ذلك في وزارة الزراعة الكندية قد يتطلب موافقات للتصريح بإجراء البحوث تحت قانون منتجات مكافحة الآفات والتشريعات . وزارة الزراعة الكندية هى المنوطة بالموافقة على حركة استيراد التقاوى أو الأجزاء النباتية وكل نشر النباتات المهندسة وراثيا وإصدار متطلبات الأمان للتجارب الحقلية والتفتيش على مواقع النشر خلال فترة ومراحل الاختبارات للتأكد من أن ظروف التجريب الموضوعة قد أتبعت . قبل إصدار الموافقة يجب استكمال كل النواحي الخاصة بالتقييم البيئى والبيانات المرجعية (EARP) . التقييم البيئى يتطلب تحليل التأثيرات البيئية مع خريطة تفصيلية للموقع في النظام البيئى الحيوى المحيط بمكان إجراء البحث وكذلك توفر أربعة مراتب عريضة من المعلومات :

المقدرة على التنبؤ بالسلوك والتأثيرات (يشمل تقييم الكائن وتركيبه وبقاؤه ونموه وتكاثره ونقل الجين والانتشار وتأثيراتها والتأثير على النظام الحيوى والنظم البيئية).

القدرة على استكشاف الكائن الحى .

القدرة لاحتواء الكائن .

القدرة على التحكم والسيطرة على التجربة بما فيها استكشاف الموقع لسنوات عديدة بعد التجربة .

بالإضافة الى ذلك فان مسئولى حكومات الولايات تحاط علما ويطلب منها إبداء الرأى من خلال السلطات التشريعية الموجودة عندها عن موقع نشر النباتات المهندسة وراثيا في الحقول (Kalous and Duke ، ١٩٨٩) . المنظمات التى تشترك في النشر الميدانى للنباتات المهندسة وراثيا يجب أن تستخدم اقتراب شديد القوة والعقلانية في مجال الأمان البيئى . هذا يتضمن التخطيط للحركة واحتواء الموقع والتخلص من النفايات والبقايا وإجراءات الطوارىء لمجابهة التسرب وحوادث النشر العرضى غير المطلوب . لا يسمح بحصاد أي محصول من نباتات التجارب الخاصة GMPs واستخدامها في الغذاء أو الأعلاف التجارية دون إذن وتصريح مسبق من وزارة الصحة الكندية .

إن وحدة التقاوى التابعة لقسم المنتجات النباتية في وزارة الزراعة الكندية مسئولة عن إعطاء الموافقات عن تسجيل الأصناف النباتية الجديدة وبيعها في كندا . يتم الموافقة

على الأصناف الجديدة بعد أن تحقق كل المتطلبات المفيدة merits خلال سنوات عديدة من المقارنات بين التجارب التعاونية بغرض التسجيل . خلافا لما هو موجود فى أمريكا حيث لا توجد تشريعات خاصة بدخول الصنف النباتى الجديد أما فى كندا تشترط التشريعات أن إدخـال أى صنف جديد من المحاصيل الرئيسية (فيما عدا المحاصيل البستانية) بغرض التجارة فى كندا يتطلب أن يسير فى خطوات التسجيل من خلال التجارب التعاونية . فى السنوات الحديثة دخلت الكانولا المهندسة وراثيا مجال التجارب التعاونية من خلال شركة مونسانتو جى تى كانولا (التى تحمل مبيد الحشائش جليفوسات وهو يحتوى على المادة الفعالة لمبيد الراوند – أب) والكانولا التى تتحمل الباستا من خلال شركة هوكست (تتحمل المبيد جلافوسينات وهو المادة الفعالة لمبيد الحشائش باستا) . لقد تم خلق موقفين جديدين. الأول يتمثل فى عدم وجود رؤية أولية عن التحمل لمبيدات الحشائش كمرتبة مفيدة فى الجمعيات . حتى يمكن الاستجابة لهذا الموقف وافقت اللجنة الغربية الكندية للكانولا ولجنة التوصيات بزيت الشلجم (Wcc / PRC) على قبول معلومات إضافية على صورة بيانات من القطاع الخاص توضح ماهية وفوائد تحمل هذه النباتات لمبيدات الحشائش ومع هذا ظل غير واضحا ما إذا كان التحمل لمبيد الحشائش يقدم مرتبة خاصة من الفوائد . الثانى يتمثل فى أن وجود النباتات المهندسة وراثيا GMPs تستند بالضرورة أن تقوم وزارة الزراعة الكندية بتحديد مناطق وظروف عازلة وطرق للتخلص وتحطيم النباتات والتى لم تكن مطلوبة من قبل . فى البداية وقبل وضع هذه التشريعات كانت البذور الناتجة من هذه التجارب تباع على المستوى التجارى . منذ أن كانت النباتات المهندسة وراثيا بدون تنظيم أو تشريع على نفس منوال النباتات الناتجة من البرامج التقليدية للتربية ثم تحوير العمليات التعاونية .

فى هذا الوقت لم تكن وزارة البيئة الكندية مشتركة بشكل مباشر فى الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا . بناء على قانون وكالة حماية البيئة الكندية (CEPA) لاتشترك وزارة البيئة الكندية فى أية تشريعات طالما كانت هناك وكالات أخرى معنية بالموضوع . إذا ظهر أى دليل يشير الى أن البيئة الكندية غير محمية يكون هناك إجبار لأخذ دور فعال . بالرغم من عدم إشراكها فى إعطاء الموافقات والتصريحات ومتابعة أداء الاختبارات الحقلية فان وزارة الصحة الكندية لا تشترك عن قرب فى تطوير النباتات المهندسة وراثيا GMPs من منظور أمان الغذاء والأعلاف . تحت مظلة تشريعات الغذاء والدواء وكذلك CEPA فان وزارة الصحة الكندية تفترض وتضع سلطات لتنظيم التعامل مع الأغذية والأعلاف الناتجة من خلال الهندسة الوراثية . لقد أصدرت هذه الوزارة حديثا

مقترح على صورة خطاب معلومات يوضح بالتفصيل خطة الوزارة لتنظيم التعامل مع هذه الأغذيــة (وزارة الصــحة الكندية ، ١٩٩٢) . تتمثل الخطة فى تقييم الأغذية وعمليات التجهــيز الجديــدة والتى لابد وان تسبق تسويق الأغذية والأعلاف من الكائنات المهندسة وراثــيا . تتوافق هذه التشريعات مع الدلائل التى وضعت حديثا فى المملكة المتحدة والتى تشــترط تشريعات مبنية على التجهيز . هذا التعارض مع الدلائل التى اقترحت حديثا من قــبل هيئة الصحة العالمية WHO , OECD وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) . تقوم السلطات الصحية الكندية حاليا بمراجعة المعلومات بناء على المدخلات العامة الواسعة مــن الجهات المهتمة بالموضوع وكذلك رجالات وهيئات الصناعة والتى تتطلب تنسيق مع الدلائل الدولية .

التشريعات فى الولايات المتحدة الأمريكية

يــتم تنظــيم الــتعامل مع النباتات المهندسة وراثيا GMPs والأغذية الناتجة منها بواســطة وكالــتان فيدراليــتان فى أمريكا. هذه الولايات تشمل وزارة الزراعة الأمريكية (USDA) وهيئة الغذاء والدواء الأمريكية FDA. هناك هيئة ثالثة تتمثل فى وكالة حماية البيــئة الأمريكــية (EPA) والتى عندها مسئوليات وصلاحيات تنظم التعامل مع المبيدات ســواء استخدمت على النباتات أو أنتجت منها. دور الوكالات فى مجال النباتات المهندسة الوراثــية يتمثل فى تطوير النباتات التى تعبر عن البروتينات القاتلة للآفات مثل بروتينات بكــتريا باســيلليس ثورينجينسيز (B.t). كل هذه الوكالات لها مسئوليات تشريعية مستقلة وتوجهات وقوانين مختلفة. الفلسفة العامة للتشريع فيما بين كل الوكالات يتمثل فى استخدام الاقتراب المبنى على النواحى العلمية على أساس كل حالة بحالتها. لقد أتفق ووفق على أن طــريقة التحول ذات تأثير قليل على أمان المنتج. لقد أصدرت كل وكالة فى الوقت الراهن مقترحاتها وأفكارها لتنظيم التعامل مع النباتات المحورة وراثيا ومنتجاتها الغذائية والمبيدات التى تنتج بواسطة النباتات.

قسم متابعة صحة الإنسان والحيوان (APHIS) يتبع وزارة الزراعة الأمريكية تنظم حركة ونشر النباتات المهندسة وراثيا وأجزاءها تحت سلطات ممنوحة لها من قانون الآفات الزراعــية والحجــر الــزراعى. تقــوم APHIS بإعطار التصاريح والموافقات لاستيراد والحركة بين الولايات أو نشر النباتات الناتجة من إقتراب الحمض النووى "الدنا" المتحول. الموافقــات غــير مطلوبة للتصدير. عندما تحتوى النباتات على مادة وراثية ناتجة من آفة نباتية فأنها تعتبر وتأخذ فى اعتبارها المواد والفقرات التشريعية (الاستثناء الوحيد حتى الآن هــو نبات أرابيدوبسيس ثاليانا المحور وراثيا والتى تعفى من التشريع). البيانات المطلوبة

للحصـــول على تصريح بنشر النباتات المهندسة وراثيا تشمل الكائن المانح، وصف الناقل، التعبير عن الصفة المرغوبة، الغرض من النشر، المواقع، البروتوكولات عدد الإدخالات، مقاييـس الاحـتواء والتخلص منها. التصريح بالحركة المحدودة بين الولايات والاستيراد يتطلب بيانات مختلفة تشمل مواصفات المادة الخاضعة للتشريع وحركتها والأصل ومحطة الوصـــول لكل الشحنات ووصف إمكانيات الاحتواء ووصف الحاويات التى تستخدم خلال الشـــحن. كـل ولايـة تشـترك بعملية التصريح. الطلب الخاص بالسماح بتداول النباتات المهندســـة وراثـيا GMPs ينسـق بواسطة مدير الإدارة بمساعدة موظفى مكتب الأمان الحيوى وتراجع بواسطة فريق التكنولوجيا الحيوية الخاصة بفرع النباتات فى APHIS.

قـبل السماح بالاتجار يجب ان تقوم هيئتى USDA/APHIS بالتحديد أن النباتات المهندســـة وراثيا ليست آفة ومن ثم لا تخضع التشريعات تحت القانون 7 CFR340 (١٦ يونيو، ١٩٨٧). التوصيات والمعلومات التى يجب نشرها فى هذا التحديد نشرت فى مسودة (خدمات التفتيش لصحة الحيوان والنبات) تشمل:

١. عقلانية تطوير النباتات المهندسة وراثيا.
٢. وصف وراثية والوضع التقسيمى وصفات التلقيح وحشائشية المحصول.
٣. وصف نظام التحول والتتابعات التشريعية المستخدمة للحصول على النباتات.
٤. وصف الجينات المانحة.
٥. تحليل الأداء الوراثى والزراعى.
٦. التتابعات البيئية لإدخال النباتات المهندسة وراثيا GMPs.
٧. أية معلومات غير مستحبة كتلك التى تؤثر على التقديرات.

بحلـــول يـــناير ١٩٩٣ قامت شركتان بنشر وثيقة لتحديد الحالات التى لا تستدعى تشـــريعات من النباتات المهندسة وراثيا. لقد ووفق على إصدار شركة Caalgers لصنف الطماطم ® Flavr Savr بينما تم تعليق وثيقة شركة Asgrow الخاصة بالكوسة المقاومة للفيروس (من قبل خدمات التفتيش على صحة الحيوان والنبات، ١٩٩٢ c,b).

لقـــد تـــم تقديم طلبات وصلت للمئات الى وزارة الزراعة الأمريكية تطلب التصريح بإجـــراء اختبارات حقلية على النباتات المهندسة وراثيا GMPs. يزداد هذا العدد سنة بعد أخرى بمعدل يؤدى الى التصفية فى APHIS لأن عمليات التصريح الحالية تتطلب الكثير مـــن الاهـــتمام. بالتبعية قامت وزارة الزراعة الأمريكية USDA بنشر مقترح مبنى على

الخـــبرات التى تجمعت لديها خلال سنوات فى مجال التصاريح بالنشر الحقلى لهذه النباتات المحـــورة وراثيا والتى إذا اتبعت ستقلل بشكل معنوى كمية المراسلات والأوراق الواجب تقديمهـــا قبل التجارب الحقلية. لقد شمل هذا الاقتراح عملية الإحاطة والمعرفة الكاملة عن النـــباتات المهندسة وراثيا قبل نشرها تؤكد أن هذه النباتات استوفت المعايير المطلوبة. فى الـــبداية يجب أن نتأكد ان النبات واحد من الأنواع التالية: الذرة والقطن والبطاطس وفول الصويا والدخان والطماطم أو اى صنف أو نوع نباتى والتى تشير تقديرات الوكالة المعنية الـــى الأمـــان من حيث التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا وحماية البيئة. أية ظروف إضافية يجـــب أن تتضـــمنها وثـــائق واســـتمارات التسجيل خاصة تلك التى توصف بشكل كامل مواصفات النباتات المهندسة وراثيا. طريقة وخطوات إجراء التجربة الحقلية يجب ان تبلغ كـــتابة لهيئة APHIS قبل الزراعة. هذا المقترح يعد تغيير كبير عما هو جارى فى الوقت الراهن وسوف يؤدى الى إصدار نداء APHIS تحت عنوان "القيود غير الضرورية على إدخال المواد الخاضعة للتشريع بناءٍ على الخبرات المتوفرة" فى ٣١ مارس ١٩٩٣ تم نشر السياسة النهائية مع بعض التحوير على فترة الإحاطة. الإحاطة تتطلب ٣٠ يوما قبل النشر وعشرة أيام قبل حركة البذور المهندسة وراثيا.

هيـــئة الغذاء والدواء FDA تشترك فى التشريعات الخاصة بالمنتجات الغذائية من النـــباتات المهندســـة وراثـــيا GMP المطلوب إدخالها للتسويق التجارى ولكنها لا تشترك مباشـــرة فى التجارب الحقلية. لقد نشرت FDA حديثا مقترحا يشمل مجموعة من الدلائل تعـــتمد علـــى الـــنواحى العلمـــية للتشريع للتصريح بتداول الأغذية والأعلاف المشتقة من النـــباتات المهندسة وراثيا. لقد اقترحت الهيئة اقتراب مبنى على نوع المنتج بما يتوافق مع مـــا هـــو معمول به مع النباتات العادية غير المحورة وراثيا. على غرار الدلائل الأخرى المقـــترحة مـــن الوكالات الأمريكية توجد فترة ٩٠ يوم للمناقشة وإبداء الرأى لدى العامة. تأخذ وكالة FDA هذه الأراء لتغيير المقترحات الموضوعة أو تعديلها.

الوكالـــة الحكومية الثالثة المشتركة فى الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs فـــى أمريكا هى وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA . فى الوقت الراهن تقوم هذه الوكالـــة بالتشريع وتنظيم التعامل مع المبيدات تحت مظلة القانون الفيدرالى للمبيد الحشرى والفطرى ومبيدات القوارض (FIFRA) والخاص بأى مادة أو مخلوط من المواد المقصود بهـــا الاســـتخدام بهدف منع أو تحطيم أو طرد أو القضاء على أى آفة . تقوم الوكالة كذلك بـــتحديد مـــا إذا كانت بعض النباتات المهندسة وراثيا تقابل وتتمشى مع هذا التعريف وإذا كانـــت تدخـــل فـــى التشـــريع مـــن قبل FIFRA كمبيدات نباتية . المبيد النباتى -Plant

pesticide يعــرف علـــى أنـــه : مواد تكافح الآفات تنتج فى النباتات وأن إعادة الوراثية ضرورية لإنتاج هذه المواد . بالإضافة الى ذلك تقوم الوكالة بتحديد ما إذا كانت العلامات الوراثــية المختارة سوف تنظم تشريعيا كمكونات خاملة . كمثال فان القطن المحور لإنتاج بروتين بكتريا B.t والمعلم المنتخب النيومايسين فوسفوترانسفيز (npt II) يجب أن أو هو فعلا تحت مظلة تشريعات وكالة EPA . ينظر لبروتين B.t على أنه مبيد والمعلم nptII كمادة خاملة . يستبعد من تحت سلطة الوكالة النباتات المهندسة وراثيا GMP التى غيرت من التركيب الغذائى والتحمل لمبيدات الحشائش الكيميائية وغيرها من تغييرات طعم وقوام الأغذيــة . لذلك فان مبيدات الحشائش وغيرها من كيميائيات مكافحة الآفات والتى تستخدم مع نباتات GMPs سوف تستمر تحت التشريع من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA .

الاختــبارات الحقلــية الموســعة فى مساحات أكبر من ١٠ آكر (٤ هكتار) والتى تتضمن المبيدات النباتية تتطلب بضرورة الحصول على موافقة وكالة EPA على التجريب فــى هــذا المستوى (EUP) . البيانات المطلوبة للحصول على موافقة EUP ترتبط بنوع الطلــب المقدم . يمكن إجراء التجارب تحت مفهوم " تحطيم المحصول Crop destruct " إذا كان الاختبار بهدف التجريب فقط والمنتج لن يصل بأى حال من الأحوال الى المستوى الــتجارى . أما إذا كان المنتج سوف يسوق تجاريا يجب تقديم ما يفيد بالسماح المؤقت أو الكــامل أو الاعفاء المؤقت أو الكامل من متطلبات السماح . عندما تؤخذ الوثيقة من EUP تقــوم وكالــة حماية البيئة الأمريكية EPA باستعراض الاستخدامات على ضوء التأثيرات المعاكسة الخطيرة على البيئة .

المعلومات المطلوبة للحصول على الموافقة والتصريح من قبل EPU .

١. المــبررات العقلانـــية التى تشمل المنتج المقصود وتوضيح أسباب الرغبة فى إجراء الاختبار.
٢. وصف كامل للنبات ومرتبته التقسيمية وغيرها.
٣. البيولوجيا الجزيئية والكيمياء الحيوية الجزيئية والتعبير عن البروتين الجديد وتوصيف الجين وأصل الكائن المأخوذ منه.
٤. الناقل وطريقة التحول.
٥. حجم الاختبار واحتياطات الأمان وحركة المواد.
٦. احتياجات آمان أخرى مثل التخزين والتداول وطرق التخلص من النباتات المتحورة.

بمجـرد رضـــى وقبول وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA من أن النبات المبيد لا يســبب أية أضرار معاكسة معنوية على البيئة يتم إصدار وثيقة التصريح فى الحال. على غــرار USPA , FDA قامــت الوكالــة EPA بإصدار دلائل للتشريع الخاص ببعض النــباتات المهندسة وراثيا والتى يطلق عليها المبيدات من النباتات. تعتقد الوكالة ان غالبية المبــيدات مــن النــباتات عندها المقدرة الدنيا لإحداث تأثيرات عكسية غير محتملة على الإنســان والبيــئة. هــذا المقــترح يوضح موقف وكالة EPA لتنظيم وتشريع التعامل مع المبيدات النباتية ذات الأخطار الكبيرة.

هذه تشمل مواصفتان عامتان:

١. اقتدار عالى لإحداث تعرض عالى متميز للكائنات غير المستهدفة .

٢. بسبب تقنية الفعل فان لها مقدرة عالية للأضرار بالكائنات غير المستهدفة .

الاهــتمامات تــتركز على التشريع على المكونات الناتجة بواسطة النباتات التى لها طــريقة إحداث فعل سامة وتخلق تعرض جديد للكائنات الدقيقة غير المستهدفة. المكونات المــتطابقة داخــل الجــنس النباتى لا تحتاج لتشريع جديد. الدلائل الخاصة بها لا تتطلب التشــريع للنباتات التى يكون فعلها الوقائى لحماية النباتات من خلال التقنيات التى تتضمن حواجز طبيعية مثل الكيوتيكل والتعبير عن المكونات الطبيعية الموجودة فعلا فى النوع فى مســتويات مقارنــة. فــى حالــة النباتات المهندسة وراثيا التى تعبر عن بروتينات غلاف الفــيروس فان وكالة حماية البيئة الأمريكية عندها قناعة وارتياح من إنه لن يحدث تعرض جديد أو مخاطر جديدة (وكالة حماية البيئة الأمريكية – إصدار عام ١٩٩٢).

الدول الأخرى

هــناك إحساس وشعور فى المجتمع الأوربى بالحاجة الى التنظيم فى مجال سياسة إدارة المخاطر المرتبطة بالاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs. لقد اتخذت خطــوة إيجابــية عندما تم نشر المركز الذى يدير نشر الكائنات الحية المهندسة وراثيا فى البيــئة (EEC ، ١٩٩٠) والتى تشمل GMPs. يقوم هذا المركز بطلب خطوات مرجعية موحــدة بيــن الــدول الأوربية. هذا يعنى أن الدول الأوربية سوف تطلب نفس المعلومات لتعضــيد النشر المقترح لهذه النباتات. هذه المطالب ستكون فى واحدة من استمارتين بناء علــى الطــرق من الاختبار. الأولى عبارة عن طلب تجريب والثانية، خاصة بالاستخدام الــتجارى. لقد أتفق على النشر بغرض التجريب سيكون محدوداً وفى نطاق صغير وتحت السيطرة والإدارة مع أقل قدر من المخاطر وبدون أية إصدارات تجارية لذلك فان الموافقة

علـــى هـــذا النشـــر تشمل ضرورة تقديم دوسيه كامل للدولة التى سيجرى فيها الاختبار. الســـلطات المسئولة فى الدولة التى سيجرى فيها التجارب سوف تقوم بتوزيع الدوسية على كـــل دول الاتحاد الأوربى للنصح وإبداء الرأى ولكن السلطات المخولة فى الدولة هى التى ستقوم باتخاذ القرار ووضع الحكم النهائى عن نشر هذه النباتات المهندسة وراثيا. بسبب أن الإصـــدارات التجارية تكون مصاحبة للنشر التجارى فان نفس العملية الابتدائية للتصريح بالتجريـــب ونشـــرة واجبة الإجراء ولو أن القرار النهائى من سلطة اللجنة المنسقة للاتحاد الأوربى. الثقة والاعتماد الأول على مدخلات السلطات الخاصة بالتجريب والتى تقوم بتقييم المخاطـــر على أسس علمية فان اللجنة التنسيقية تتطلع الى المصداقية والعقلانية. فى حالة تذبـــذب وعـــدم وضوح رؤية وقرار السلطات الأولى المنوطة بالموافقة على التجريب فان القـــرار الـــنهائى يصبح مسئولية اللجنة الاستشارية للاتحاد الأوربى والتى يجب أن تستند لتفصـــيلات من الأسس العلمية تعضد القرار. بعد استلام طلب التجريب يكون أمام اللجنة ٩٠ يومـــا للقـــبول أو طلب معلومات إضافية عن نشر التجريب. فى حالة النشر التجارى يضاف ٣ شهور أخرى للجنة الاستشارية لاستكمال الدراسة المتأنية للدوسيهات والوصول الـــى اتفـــاق. هـــناك اتفـــاق عام بين كل دول الاتحاد الأوربى حول سياسة نشر النباتات المهندسة وراثيا على مستوى دول السوق.

الـــيابان مـــن الـــدول التى تتخذ حيطة كاملة نحو تنظيم وتشريع الاختبارات الحقلية ويـــبدو أنها تأخرت فى تطور السياسة التشريعية الخاصة بتجريب ونشر النباتات المهندسة وراثيا. فى الوقت الحالي يتطلب الحصول على الموافقة على إجراء الاختبارات الحقلية فى الـــيابان توفـــر بـــيانات كاملـــة من دراسة شاملة فى حجم النمو ويتبعها تجارب الصوب الزجاجية. يجب أن تجرى هذه التجارب فى اليابان كما يجب أن تقدم البيانات وتراجع قبل اتخـــاذ اى قـــرار خاص بالنشر الميدانى الحقلى وبعناية. الاختبار الحقلى الأول يتطلب أن تكـــون القطع التجريبية كاملة الزراعة لتقليل المخاطر البيئية. مع تعليق نتائج هذا الاختبار قـــد يـــتوجه أحـــد الطالبين للحصول على موافقة لإجراء مزيد من النشر التقليدى للنباتات المحورة وراثيا. اليابانيين يقومون فى الوقت الراهن بوضع مسودة دلائل لأنهم على دراية كاملـــة بالمنـــتجات التى ستصبح متاحة من خلال الهندسة الوراثية وهى GMPs كما أنهم لايريدون خلق آية حواجز تجارية مع الدول المصدرة.

النواحى البيئية Environmental aspects

التوجه نحو قبول الاختبارات الحقلية للنباتات المهندسة وراثيا GMPs يختلف ويتفاوت. من المناقشة التى ذكرت قبلا يتضح أنه بينما تختلف التوجهات إلا أن أنواع الأسئلة والأساس العلمى لاتخاذ القرارات متضمنة الإجابة عن نفس الأسئلة الأساسية. فى كل الوثائق التى تعضد GMPs تتم مناقشة ثلاثة نواحى:

العقلانية فى تطوير المنتج وإجراء الاختبار والفوائد المرجوة .

التأثيرات البيئية .

التأثير على أمان الإنسان والحيوان .

للحكم على التأثيرات البيئية للنباتات المهندسة وراثيا يجرى تقييم بيئى والذى يتطلب معلومات:

أ- حركة الجينات (انتشار اللقاح وكفاءة العبور الخارجى) .

ب- الصفة وتأثيرها على ايكولوجية النبات (التأثير على اللياقة فى البيئة، كفاءة وقدرة الغزو والمقدرة الحشائشية) وكذلك التأثيرات الثانوية والتى تعرف على أنها تأثيرات غير ممكن التنبؤ بها على الهندسة الوراثية مثل مستويات تغيير نواتج التمثيل (الممثلات) الثانوية.

ت- أمان منتجات الجين تجاه الكائنات غير المستهدفة واستخداماتها .

ث- مقدرة وعظم المشاكل البيئية غير المرغوبة فيها (حركة الجين من خلال تقنيات أخرى بخلاف التقنيات داخل النوع).

تجدر الاشارة فى هذا المقام التركيز علي النواحي البيئية لنوعين من النباتات المهندسة وراثيا والتى أختبرت على امتداد سنوات عديدة فى الحقل وفى مناطق متعددة. الأول هو القطن المقاوم للحشرات (IRC) والثانى هو الكانولا (لفت الشلجم) الذى يتحمل مبيد الحشائش جليفوسات أى الكانولا المقاوم للجليفوسات Canola (GTC. في هذا المقام يجب التذكرة بثلاثة موضوعات ترتبط بشكل واسع بالنواحى البيئية للنباتات المهندسة وراثيا. الأول يتمثل فى إمكانية نقل هذه الجينات خلال الأحياء بشكل عشوائى وما بين الأنواع مما يثير نوعان من الانتقادات. بينما هناك إمكانية خلال التطور فان اتجاه حركة الجين يمكن أن تحدث فان كل الأدلة تشير أن حركة الجينات من النباتات الى الكائنات الدقيقة أو للأنواع غير المرتبطة بالنباتات محتملة الحدوث (Goodman and Newell، ١٩٨٥). العديد من الأمثلة عن إنسياب الجين حتى بين الأنواع المتوافقة يمكن أن تفسر من خلال التطور المتقارب. هذه الحركة العشوائية للجين تظل مثيرة للاستطلاع حتى يمكن

إثـــبات شىء مخالف من التجريب. الثانى أن معظم التغيرات الوراثية تقلل أكثر منها تزيد مــن اللـــياقة (Crawley، ١٩٩٢). الأنواع والطرز الوراثية البرية عادة تكون أكثر لياقة وتكون منافسات قوية وكذلك تكون أكثر حشائشية. حيث أن معظم التغيرات الوراثية تسوى النبات تحت بعض النواحى البيئية المؤثرة فانه لا يتوقع أن النباتات المهندسة وراثيا GMP ســيكون لها اقتدار كبير كأن تكون آفة عنه كصنف تجارى يمكن الحصول عليه من خلال التربــية التقلــيدية والانـــتخاب. فى النهاية لا يوجد أى دليل على الإطلاق من أن الثبرات التاجــية المشتقة من الأجروباكتيريوم تومى فيسيانس عديمة الأذرع التى تعول التحولات (Irc aand GT Canola) (Huttrer وآخرون، ١٩٩٢). هذا يوضح أن الكائن يقل بدرجة كبيرة فى مزارع الأنسجة ولا يتضاعف فى البذور.

ثانـيا: نظرة سريعة عن ملامح الأمان الحيوى فى مصر للمستحضرات الحيوية والنباتات المهندسة وراثيا

عـندما تناولت التشريعات الخاصة بالنباتات المهندسة وراثيا والكائنات الدقيقة كذلك فـى الـدول المتقدمة وأهمية الأمان الحيوى كان لا بد أن أبحث عن هذا الأمان فى مصر لأننا مهيئين تماما ومستهدفين لدخول هذه التكنولوجيا الجديدة من الخارج أو من معاملنا الى الزراعة المصرية والبيئة المصرية . لذلك توجهت الى أخى وصديقى العزيز أ٠د٠ مجدى مدكور مدير معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية التابع لوزارة الـزراعة أسـأله العون والمشورة. لقد تفضل سيادته بإعطائي نسخة من نظام ومحددات وتشـريعات "تأسيس نظام قومي للأمان الحيوى فى مصر: الإرشادات والأنظمة" والذى تم إعـداده عام ١٩٩٤. سوف أضع فقط بعض نواحي هذا الإصدار كما هو دون تعليق حتى يتأكد القارىء الكريم أننا نتواكب مع متطلبات الأمان على نفس المستوى إن لم يكن أفضل من الدول المتقدمة.

تحـتل تطبـيقات التقنـية الحيوية موقعا متميزا فى التوسع العلمى الكبير خلال هذا العقـد. ولمـا كـان إنتاج وانتشار نواتج الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية قد أثار احـتمال تعـرض الإنسـان والبيئة للمخاطر لهذا كان يتعين أن تجرى كافة بحوث التقنية الحـيوية فـى إطـار ضوابط منظمة للأمان الحيوى. تعنى هذه الوثيقة بإنشاء نظام قومى للأمان الحيوى فى مصر بهدف تقديم دليل لمساعدة صانعى السياسات فى إنشاء أنسب نظام قومـى للأمـان الحيوى حيث لا يتوفر هيكل يلائم هذا النظام حاليا. وقد تم إعداد الهيكل المقترح للنظام القومى ويتضمن المرفقات الإرشادات الخاصة بالأمان الحيوى بعد تطويرها بمعرفة المنظمات العالمية المتخصصة.

إن إقامة مثل هذا النظام سوف يؤكد استمرار التقنية الحيوية فى أمان دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية مخاطر محتملة.

مقدمــــة :

المقصود بالتقنية الحيوية أى تقنية تستخدم الكائنات الحية أو مستخرجاتها فى تطوير أو تحســين إنــتاج المحاصيل والأغذية والأدوية ومستلزمات الرعاية الصحية والأمصال والصــناعات الكـيماوية ومنــتجاتها كماً ونوعاً وتتدرج هذه التقنيات بين التقنيات الحيوية التقليدية واسعة الانتشار والتقنيات الحديثة التى تعتمد على طريقة إندماج الحامض النووى الديوكسـى ريبوزى المعاد تجميعه (r- DNA) والتى تعرف بالهندسة الوراثية. وتتضمن

أغـراض اسـتخدام نواتج الكائنات الحية الدقيقة المطورة وراثيا للسيطرة على الأمراض ومبـيدات الحشـائش فى الزراعة وإنتاج اللقاحات وتطهير النفايات من الكيماويات السامة والترشـيح المـيكروبى للخامات المعدنية وتحسين استخلاص الزيوت البترولية. وتكتسب النـباتات المعاملـة بالهندسـة الوراثية عدة مزايا منها زيادة المقاومة للأمراض ومبيدات الحشـائش، تحمـل الجفاف والظروف البيئية الأخرى الغير ملائمة، تقليل الفاقد من المواد الغذائية أثناء التخزين والنقل وزيادة القيمة الغذائية للمنتجات الغذائية.

الأمان الحيوى

يسـتخدم هـذا المصطلح فى شرح السياسات والطرق المتبعة فى تأمين التطبيقات الآمنة للبيئة للتقنيات الحيوية الحديثة. ويكتسب سعة الانتشار بقدر ما تسعى كثير من الدول للإفـادة من التطبيقات العلمية الحديثة فى الزراعة والطب والبيئة دون أن تتعرض الصحة العامة والأمان البيئى للخطر.

وقـد أسست العديد من الدول الصناعية الأنظمة الخاصة بقواعد التقنية الحديثة، كما قامت اللجنة الاستشارية بمعهد الصحة القومى (NIH) بتطوير أساليب اختبار وتقييم الأمان للـتجارب المقترحة ونشرت إرشادات مكثفة للشروط التى يقتضى عندها إجراء نماذج من الـتجارب المتنوعة. وتقتصر إرشادات معهد الصحة القومى على الاستخدام المعملى لمادة r-DNA دون إطـلاق الكائـنات المعاملـة وراثـيا الى البيئة ويتضمن المرفق رقم "١" إرشادات معهد الصحة القومى.

ولمـا كـان اختبار الحامض النووى الديوكسى ريبوزى المعامل بالهندسة الوراثية يجـب أن يجـرى خارج المعمل فهناك طريقة تعرف بالإطلاق المتانى Deliberate أو الإدخال المخطط Planned introduction لإدخال هذه الكائنات المعاملة فى البيئة مما قد تنشأ عنه بعض المخاطر المصاحبة لتمرير هذه الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية.

أسئلة تتعلق بالتعريف بالأخطار التى تنشأ عن إطلاق الكائنات الحية الدقيقة فى البيئة:

- هـل يمكـن ان ينشأ مصادفة عن استخدام تكنولوجيا r-DNA أمراض وبائية جديدة للنبات؟
- هل يقود استخدام r-DNA الى تحويل الكائن غير المرضي الى كائن ممرض بمحض الصدفة؟.
- هل من الممكن انتشار الجين المستحدث فى الأوساط الميكروبية ؟

- هل هناك تأثير للكائنات الحية الدقيقة المعاملة بالـــ r-DNA على إحداث تغير بالتجمع الميكروبى للتربة ؟
- حـــددت الأكاديمـــية القومـــية الأمريكية للعلوم (NAS) المخاطر الناتجة عن إطلاق الكائنات المعدلة بالهندسة الوراثية فيما يلى :
- ليســت هـــناك أيـــة شواهد تنبىء عن وجود خطر واحد سواء من استخدام تقنيات r-DNA أو من نقل الجينات بين كائنات متباينة .
- تتماثل المخاطر المصاحبة لإدخال الكائنات المعاملة بالهندسة الوراثية من حيث النوع – بتلك المصاحبة لإدخال كائنات غير مطورة أو الكائنات المطورة بطرق أخرى .

فى خطوة لاحقة دعت منظمة الأمم المتحدة للتنمية الصناعية (UNIDO) الى عقد اجتماع لمجموعة من الخبراء بفيينا فى مارس ١٩٩١ ضم عشرين خبيراً يمثلون النواحى الأكاديمـــية والصـــناعية والحكومات من الدول النامية والمتقدمة والمنظمات الدولية لإعداد مســودة دســتور (أو مجموعة مبادىء) تحكم التداول الآمن واستخدام وإطلاق الكائنات الحــية المعدلة التركيب الوراثى فى البيئة وذلك فى محاولة لإيجاد تجانس بين الإرشادات القائمــة واقتــباس الحد الأدنى من المبادىء المقبولة على المستوى العام وتقديم إطار عمل دولى فى صورة مجموعة مبادىء لإطلاق الكائنات الحية المعاملة بالهندسة الوراثية، وذلك بهدف إقامة الحد المقبول من التعاون الدولى اللازم.

وقــد عــنى بــان تكون هذه الإرشادات التى تم التعبير عنها فى هذا الكود صديقاً للمســتخدم بغرض: تنشيط مراحل التقنية الحيوية وتقدمها والتى يمكن تطويرها أو إمتدادها لتــتلائم مـــع حالات بعينها تبعا لرغبة كل دولة ويتضمن المرفق رقم (٢) الـــ Code of conduct هذا الكود.

ولقد وجهت الدول النامية أيضا بالطلب المتزايد على إدخال أبحاث الحامض النووى الديوكســى ريبوزى المعاد تجميعه r-DNA ونتيجة للحاجة العاجلة للمجتمع العلمى لتوفير المشورة لكل من الباحثين والمنظمين فى مجال تقييم المخاطر المصاحبة للتقنية الحيوية.

لهذا يتعين إنشاء نظام قومى للأمان الحيوى فى إطار التنظيم القائم والمعاهد العلمية المــتوفرة والأفراد والتشريعات الحالية بأكبر قدر مستطاع بحيث يقدم الآليات المناسبة لكل مــن التطبــيقات المحتواه وغير المحتواه بما يضمن أمان المنتجات المستخدم فيها أساليب التقنية الحيوية مثلما هو الحال باستخدام التقنية الحيوية التقليدية.

هــذا ويتطلــب إعداد سياسة قومية لقواعد أبحاث الى r-DNA فى الدول النامية توفر العناصر التالية :

١- إيجاد هيكل قومى تنظيمى مع توفر الدعم المالى، ويتألف الهيكل التنظيمى من:

أ – لجان الأمان الحيوى التى تتكون منها السلطة التنظيمية .

ب- مجموعـــة من التشريعات الخاصة بالأمان الحيوى والقواعد والإرشادات التى يجب اتباعها .

٢- إتاحة التمويل والخبرات العلمية والفنية المناسبة لتحليل قيم المخاطر وأشكالها .

٣- التنسيق مع المنظمات الدولية .

٤- تحديد آلية لتجميع المعلومات الخاصة بالظروف الزراعية والبيئية المحلية .

٥- أنظمة لمتابعة تطور التقنية الحيوية التى قد تؤثر على صحة العاملين وسلامتهم.

٦- توفر الثقة فى خبرة صانعي القرار .

٧- أنظمة لتوفير المعلومات والتوعية اللازمة للجمهور .

تقــدم هذه الوثيقة مقترحات خاصة للسياسات والإجراءات التى قد ترغب السلطات الوطنــية فى الأخذ بها عند إنشاء نظام الأمان الحيوى، كما تتضمن اقتراح هيكل تنظيمى وأمثلة لطرق تقييم المخاطر والإرشادات الملائمة للبيئة المصرية.

ومــرفق طــيه المستويات المقبولة دوليا لمجموعة المبادىء مع تقديم أمثلة للبحث مقيمة في إطار الإرشادات. ومما يجدر ذكره أن جميع هذه البنود تقدم وتناقش كأمثلة لخطة متناســقة لــنظام الأمـــان الحيوى. كما أنه من الأهمية بمكان الإشارة الى ان هذا العرض عكــس مخـــتارات بسيطة من العدد الكبير من الآليات المستخدمة دوليا على نطاق واسع لأغراض الأمان الحيوى.

خــتاماً تجدر الإشارة الى أن المخاطر التى قد تتعرض لها صحة الإنسان والبيئة لا تقتصــر على التقنية الحيوية بوجه خاص، بل أن هذه الأسئلة قد طرحت كعنصر هام فى مجال تقنية وتنظيم والارتفاع بمستوى المنتجات باستخدام أكثر من التقنيات القديمة والحديثة مثل الكيماويات والمستحضرات الدوائية.

أصــبح إقامـــة نظام قومى للأمان الحيوى ضرورة ملحة نتيجة الزيادة السريعة فى إدخـــال تطبيقات التقنية الحيوية فى مصر. إن إقامة منظومة أمان حيويى قومى مع ضمان الالتزام بقواعدها يحقق الآتى:

١- التأكيد عل استمرارية التقنية الحيوية بصورة آمنة دون تعريض العاملين والمجتمع والبيئة لأية آثار ممكن تجنبها .

٢- تسهيل الوصول الى التقنيات الحيوية الحديثة المبتكرة بالخارج حيث أن كثير من المعاهد الدولية والشركات لا تقوم باختبار كائنات حية معاملة بالهندسة الوراثية إلا بعد الموافقة عليها من جهة حكومية مسئولة .

٣- سرعة تقبل المجتمع مع ما يتبعه ذلك من مزيد من التنمية للتقنية الحيوية الحديثة .

المبادئ الأساسية لإعداد سياسة قومية لتنظيم التقنية الحيوية

١. المراجعة الدورية لإبراز الخصائص والمخاطر التى تم التعرف عليها لمنتجات التقنية الحيوية دون الاقتصار على الطريقة التى أحدثتها بصفة أساسية.

٢. يجب أن تكون مراجعة التقنية الحيوية التى يتعين مراجعتها مصممة على أساس معايير الكفاءة والتأثير مع التأكيد على حماية الصحة العامة وأمان البيئة .

٣. يراعى أن تتكامل الاحتياجات التنظيمية للتقنية الحيوية الحديثة فى إطار قواعد المنظومة الشاملة التى تحكم عملية إدخال منتجات جديدة فى القطاع الزراعى.

٤. أن درجة معرفة سلوك الكائنات المثيلة عند إطلاقها فى البيئة يجب أن تحدد مستوى التنظيم المطلوب بحديه الأدنى والأقصى اعتمادا على درجة المخاطر التى تم التعرف عليها .

٥. يتعين أن تكتسب برامج المنظومة المرونة والقدرة على سرعة التكيف مع المعلومات الجديدة والتقدم السريع فى التقنية الحيوية .

<u>الجزء الأول</u>: لجان الأمان الحيوى

إن إنشاء لجنة استشارية قومية للأمان الحيوى يعتبر الخطوة الأولى فى تطوير السياسات الملائمة والإجراءات الخاصة بالتقنية الحيوية، حيث تقوم هذه اللجنة بسرعة وضع السياسات وتحديد الإجراءات التى تحكم استخدام التقنية الحيوية الحديثة فى البلاد.

١- اللجنة القومية للأمان الحيوى National Biosafety Committee (NBC)

شكلت لجنة مصرية قومية للأمان الحيوية تضم أعضاء من واضعي السياسات والمصممين والخبراء العلميين فى الزراعة والصحة والبيئة من الحكومة والمعاهد الأكاديمية للبحوث .

الجزء الثاني: إرشادات (احتياطات) الأمان الحيوى

١- تقدير أو تقييم المخاطر

إن مدى تعرض صحة العاملين والآخرين بالقرب من مكان العمل هو العنصر الرئيسى الهام فى تقدير المخاطر المصاحبة لاستخدام الكائنات الحية المحورة وراثيا.

هذه المخاطر تتناسب مع مجال وطبيعة العمل وكل الأجهزة المنظمة تفضل الاستخدام المحدود لها فى مجال البحث والتنمية.

أما الاستخدام الواسع النطاق الذى قد يسبب خطورة على الصحة أو البيئة المحيطة وزيادة المخاطر المحتملة بالبيئة عندما قد يحدث تسرب الكائن الحى من منطقة الإنتاج لذلك فانه يجب استخدام طرق أخرى أكثر صرامة لاحتواء هذه الخطورة.

الاحتواء ممكن أن يكون عملا طبيعيا ومثال ذلك الحواجز التى تحد من تسرب الكائنات الحية أو احتواء حيويا ومثال ذلك التحكم الفسيولوجى فى حيوية وتضاعف وتكاثر الكائن خارج البيئة الأصلية.

فى عام ١٩٨٩ وضعت الأكاديمية الدولية للعلوم (NAS) الأسئلة الثلاثة التالية للحكم على درجة الخطورة:

هل نحن ملمين بخواص الكائن الحى والبيئة المحتمل استقدامه إليها ؟

هل نستطيع أن نتحكم فى الكائن الحى بكفاءة ؟

ما هى التأثيرات المحتملة على البيئة وهل الكائن الحى أو الخاصية الوراثية المستقدمة تبقى لوقت أطول من المتوقع أو تنتشر بالبيئة الغير مستهدفة ؟

إن التكنولوجيا الحديثة تثير العديد من الأسئلة على درجة الخطورة والتى تفتقر الى قلة أو انعدام المعلومات التى تساعد فى تقييمها .

والتعريف المقترح يكون :

الخطر = احتمالية الخطورة × درجة الخطورة

كما شرح مسبقا أن التكنولوجيا الحيوية تهدف الى إنتاج محاصيل بخواص جديدة مفيدة للجنس البشرى وهذا يعنى إذا كان هناك أى زيادة فى الخطورة يجب أن يتوازن مع المنفعة الناتجة من المحصول الجديد وسنعتبر الخطر بأنه الخطر المقبول.

$$\text{الخطر المقبول} = \frac{\text{احتمال المخاطرة} \times \text{درجة الخطورة}}{\text{المنفعة من المنتج}}$$

وحــتى يتسنى لنا فهم الظروف التى يمكن أن تؤدى الى تحول نبات معدل التركيب الوراثى الى حشيشة ضارة أو ذو تأثير ضار على البيئة ، فأنه يجب معرفة تأثير العوامل فى الموديل التالى:

معــدل زيــادة النبات المعدل التركيب الوراثى فى بيئة معينة = معدل نمو وتكشف النبات

+ إنتاجه للبذور (الوقت والمدة)
+ بقاء الأجزاء الخضراء حية (مطروح منه معدل الموت)
– تأثير المنافسة مع النباتات الأخرى من نفس النوع
– تأثير المنافسة مع الأنواع الأخرى من النباتات
– تأثير الآفات الزراعية (الحشرات والفقريات)
– تأثير الفطريات وأمراض النبات الأخرى
+ هجرة البذور المنقولة وراثيا من أماكن أخرى
+ معدل إنتاج النباتات المعدلة التركيب الوراثى من بذور ساكنه فى التربة

يجــب أن تقــيم الظروف التى يجرى تحتها البحث بالكائنات الحية المحورة وراثيا بأمــان بالمقارنة مع الظروف المقبولة طبيعيا لإجراء بحوث على الكائنات الحية الأصلية (الابوية) .

وعلى ذلك فأن تقييم الأمان يكون ضروريا لتحديد مستوى العمل الأمنى .

٣- *تحديد مستوى العمل الأمنى LSC*

أوصــت اللجنة الاستشارية لبحوث التكنولوجيا الحيوية الزراعية بخطوات متدرجة للســكرتير المســاعد للعلــوم والتربية لتقييم مستوى العمل الآمنى للكائنات الحية المحورة وراثــيا والــتى تنقسم الى ثلاث مستويات وتحديد مستوى العمل الأمنى ذو أهمية عظمى لتحلــيل خطــورة اســتخدام الكائــنات المحورة وراثيا على صحة الإنسان والنظام البيئى الطبيعى .

الخطوة الأولى:

تحديد مستوى العمل الآمنى للكائنات الأصلية (الابوية) والتى تعتمد على خاصيتين هما :

١. درجة الخطورة على صحة الإنسان والبيئة المحيطة او النظام البيئة الطبيعى.

٢. القـــدرة علـــى التعامل أو التحكم فى الكائن الحى أثناء استقدامه المخطط الى البيئة وبناءاً عليه يجرى البحث بطريقة آمنة .

المستوى الأول للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الابوية)

الكائن الحى يؤدى الى خطر قليل للصحة وليس هناك خطر غير معقول على البيئة المعاملـــة أو النظام البيئى الطبيعى. هذه الكائنات الحية والتى لها مساهمات بيئية فى البيئة الخاصة المستقبلة تكون مفهومة.

بعض المساهمات فى الخليط ممكن أن تشير الى المستوى الأول هى:

١. ليس هناك تاريخ لآثار سيئة فى البيئة المستقبلة.
٢. قـــدرة ضـــئيلة علـــى الـــتحور لتصبح كائنات حية ضارة فى البيئة المستقبلة (سهلة الوصول).
٣. احتمال ضئيل لبقائها فى البيئة المستقبلة (سهلة الوصول).

المستوى الثانى للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائـــنات الدقـــيقة والتى لها مساهمات بيئية فى البيئة المستقبلة ممكن أن تؤدى الى خطـــورة مـــع صحة الإنسان والتى ليست بالضئيلة أى ممكن تؤدى الى ضرر أو خطورة غـــير معقولـــة للنظام البيئي الطبيعي والتى يمكن ويجب أن تعامل وتحكم بواسطة حصر مناسب (وضع مناسب).

المستوى الثالث للعمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية (الآباء)

الكائنات الحية التى لها صفات بيئية فى البيئة المستقبلة يمكن أن تؤذى الى خطورة علـــى الصـــحة الآدمية والتى ليست بصورة ضئيلة أو تؤدى الى خطر غير معقول للبيئة المعاملـــة أو الـــنظام البيئى اللطبيعى. وليس هناك حصر يمكن إجراءه ليؤكد أن التطبيق الآمن للبحث خارج الإمكانيات المتوفرة.

بعض الخصائص التى تحدد المستوى الثالث للأمان للكائنات الحية هى :

١. ثبات لتأثير ضار على البيئة المخصصة .
٢. القدرة على البقاء والانقسام فى البيئة .
٣. ليس له حالة مستقرة فى البيئة .

٤. كثرة تبادل المعلومات الوراثية مع تأثير ضار .
٥. افتقاد الطرق المؤثرة للحد من انتشار أو تسرب الكائنات الحية .
٦. افتقاد الطرق الكافية للسيطرة أو منع حالات الانتشار .

الخطوة الثانية : تحديد تأثير التغيرات الوراثية على مستوى العمل الأمنى

يجب أن يقيم التغيرات الوراثية على أساس تأثيرها على صفة الكائن الحى الأصيل (الابـوى) والتى قد تم تقييمها فى الخطوة الأولى. حيث أن التحور الوراثى قد لا يكون له تأثير على الأمان أو يتطلب زيادة الأمان الحيوى.

تأثير التحور الوراثى على الأمان يجب أن يقيم على الأسس التالية :

١. تأثير مباشر للكائن الحى على صحة الإنسان أو البيئة .
٢. تأثير غير مباشر للكائن الحى من خلال المواد التى ينتجها .
٣. تأثيرات التبادل الوراثى مع الكائنات الحية الأخرى .

فى الخطوة الثانية يجب على الباحثين أن يفحصوا طريقة التحور الوراثى والخواص الجزيئية وثبات الجينات المحورة والتعبير والوظيفة وتأثيرات الجينات المحورة .

النوع الأول: التحور الوراثى الذى يقلل العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة

الـتحورات التى تمنع أو تعوق نشاط الجين أو الجينات المسئولة عن الصفات مثال ذلـك: القـدرة علـى إحداث المرض والخصوبة والبقاء والتلاءم بطريقة تؤدى الى زيادة الأمان للكائن الحى .

النوع الثانى: التحور الوراثى الذى ليس له تأثير على العمل الأمنى للكائن الحى المحور

يتطلـب ذلـك دراية واعية بالبيولوجية الجزيئية والعلوم الأخرى التى تطلب الخبرة المناسـبة والـتى توضـح أن التحور قد تم توصيفه جيدا وأن وظيفة الجين وتأثيره قد تم استيعابها لتوقع الأمان .

التحورات تشمل :

١. إدخـال أو حـذف أو إعادة ترتيب جزء من الأحماض النووية والذى ليس له أى عواقب فى المظهر الخارجى أو الوراثى فى البيئة .

٢. إدخـــال او حــذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التى لها عواقب متوقعة فى المظهــر الخارجى أو الوراثى فى البيئة وغير مرغوبة وممكن أن تؤدى الى تأثير ضار إضافى الى الصحة الآدمية والبيئة .

الـــنوع الثالـــث: الـــتحور الوراثـــى الـــذى يزيد العمل الأمنى للكائن الحى المحور تشمل التحورات ما يلى :

١. إدخـــال أو حذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية التى تؤثر على تعبير الجينات ولكـــن الوظائف أو التأثيرات ليس مفهومة بصورة كافية بالتأكيد ما إذا كان الكائن الحى المحور يؤدى الى خطر أكبر من الكائن الحى الغير محور .
٢. إدخـــال او حـــذف أو إعادة ترتيب الأحماض النووية والتى لها عواقب معروفة أو متوقعة في الشكل الظاهرى أو الوراثى فى البيئة التى تؤدى الى آثار سيئة إضافية على صحة الإنسان والبيئة .

الخطوة الثالثة: تحديد مستوى العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة وراثيا

تصنف الكائنات الحية المحورة وراثيا تبعا لدرجة الأمان الحيوى المطلوبة الى ثلاث مســـتويات تـــبعا لتأثير التحور الوراثى على خصائص أو صفات الكائن التى تأثرت وقد تؤدى الى تغير مستوى العمل الأمنى للكائنات الحية المحورة بالمقارنة بالكائن الحى الغير محور.

- مســـتوى العمـــل الأمنى للكائن الحى المحور وراثيا يعتمد على نفس الخصائص المطـــبقة لـــتقدير أو تحديد مستوى العمل نفس الخصائص المطبقة لتقدير أو تحديد مستوى العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل (الأبوى).

المستوى الأول (الكائن الحى الأصيل)

المســـتوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى مع النوع الأول من التحور يعتبر LSC-1 للكائن الحى المحور وراثيا .

المستوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى من النوع الثاني من التحور يعتبر LSC-2 للكائن الحى المحور وراثيا .

المستوى الأول للعمل الأمنى للكائن الحى الأصلى من النوع الثالث من التحور يؤدى الى LSC-1 , LSC-2 , LSC-3 كائنات حية محورة وراثيا تعتمد على درجة العمل الأمنى كالآتى :

١. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة طفيفة فى العمل الأمنى وعليه الخطـر لصحة الإنسان تبقى طفيفة أو مهملة والخطورة للبيئة المعاملة أو النظام البيئى الطبيعى . تبقى معقولة بدون الاحتياج الى مقاييس منع وعليه تبقى الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1.

٢. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة العمل الأمنى للدرجة التى فيها الخطورة لصحة الإنسان ليست مهملة أو الخطر للبيئة أصبح ليس معقول ولكن الحصر الممكن إجراءه والمتاح لإجراء البحث مع وجود خطورة ضئيلة على صحة الإنسان والبيئة ومن ثم الكائن الحى المحور يكون LSC-2 .

٣. إذا كان التحور من النوع الثالث يؤدى الى زيادة العمل الأمنى للدرجة التى يكون فيها الإدخال للبيئة غير مستطاع التعامل معه أو التحكم فيه بصورة كافية لتحقيق خطورة ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على البيئة . ومن ثم يكون الكائن الحى المحور يكون LSC-3 .

المستوى الثانى للكائن الحى الأصيل (الأبوى)

١- المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الأول التحورات تؤدى الى LSC-1 أو LSC-2 للكائن الحى المحور وراثيا تتوقف درجة العمل الأمنى على ما يلى :

أ - لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمنى الى الحد الذى يؤدى فيه الكائن الحى الى خطورة منعدمة أو ضئيلة على صحة الإنسان وخطورة معقولة على النظام البيئى المعامل أو الطبيعى . بدون الحاجة الى مقاييس حصرية وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .

ب- لو كان التحور من النوع الأول يقلل العمل الأمنى والخطورة على صحة الإنسان تكون منعدمة والخطورة على النظام البيئى الطبيعى أو المعامل تكون معقولة فقط عندما تعامل باستخدام المقاييس الحصرية وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2.

٢- المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الثانى المحور يظل LSC-2 كائن حى متحور وراثى . مقاييس حصرية مناسبة ضرورية لنشر المخطط فى البيئة.

٣- المستوى الثانى من العمل الأمنى للكائن الالحى الأصيل من النوع الثالث المحور ينتج فى LSC-2 أو LSC-3 كائن حى محور وراثى . تعتمد على درجة الزيادة فى العمل الأمنى كالآتى :

أ – إذا كـان المستوى الثالث للتحور يرفع من درجة الأمان الحيوى ولكن الإدخال المخطـط للبيـئة يظـل ممكن معاملته أو التحكم فيه بواسطة قياسات حصرية مناسبة ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .

ب- إذا كان النوع الثالث للتحور يرفع درجة العمل الأمنى للدرجة التى يكون معها تأكـيد غـير معقول بأن الإدخال المخطط فى البيئة يمكن أن يعامل أو يحكم . ومن ثم يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 يجرى البحث تحت مقاييس حصرية حتى يكون هناك تأكيد بأنه يحكم بأسلوب آمن .

المستوى الثالث للكائنات الحية الأصلية (الأبوية)

المســتوى الثالث للعمل الأمنى للكائن الحى الأصيل من النوع الأول المتحور يؤدى الــى كائن حى محور وراثيا LSC-3 , LSC-2 , LSC-1 معتمدا على درجة التقليل فى العمل الأمنى كما يلى :

١. لــو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى الى الدرجة التى فيها الإدخال المخطط فى البيئة يؤدى الى خطورة منعدمة أو قليلة على صحة الإنسان خطورة معقولــة على النظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-1 .

٢. لو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى ولكن المقاييس الحصرية تكون ضرورية للإدخال المخطط فى البيئة مع خطورة منعدمة لصحة الإنسان وخطورة معقولة للنظام البيئى المعامل أو الطبيعى وعليه يكون الكائن الحى المحور وراثيا LSC-2 .

٣. لــو كان النوع الأول من التحور يقلل العمل الأمنى ولكن ليس للدرجة التى يمكن بهــا معاملة أو التحكم فى الإدخال المخطط للكائن الحى لتحقيق خطورة منعدمة علــى صحة الإنسان وخطورة معقولة للنظام البيئى الطبيعى أو المعامل ومن ثم وعلــيه يكــو الكائن الحى المحور وراثيا LSC-3 . يجب أن يجرى البحث فى إمكانيات متاحة .

- المستوى الثالث من العمل الأمنى للكائنات الحية الأصلية مع النوع الثالث أو الثانى من التحور ينتج كائنات حية محورة وراثيا LSC-3 .

٣- احتياطات الأمان الحيوى

احتياطات الأمان الحيوى مصممة للتأكد من أن المنتجات من التكنولوجيا الحيوية ليس لها تأثير على البيئة أو الزراعة وكذلك منع انتشار الميكروبات المهندسة وراثيا من الانتشار العشوائى.

بالإضافة لحماية الجماعات المحيطة المتعاملين والباحثين فى مجال استخدام مثل هذه المنتجات بدءا من مرحلة البحوث حتى التوزيع التجارى .

٣-١- احتياطات الأمان الحيوى بالمعامل

ممنوع تخزين الأطعمة وتناول المأكولات والمشروبات والتدخين.

ممنوع استخدام الماصات التى تستخدم بالفم.

ارتداء الملابس الخاصة بالمعمل إجباريا ويجب أن تخلع قبل الخروج من المعمل.

يجب أن تطهر الأسطح المستخدمة بواسطة الصابون والكحول بعد انتهاء العمل اليومى.

النفايات أو الفضلات يجب أن تطهر بواسطة التعقيم أو الحرق.

تكرار غسيل الأيدى إجباريا(على الأقل تواجد حوض واحد لغسل الأيدى)

يجب اجتناب لمس الميكروبات المحورة وراثيا والمواد البيولوجية المستوردة ويجب لبس الجوانتى عند التعامل مع هذه المواد ولا تستخدم هذه الجوانتيات إلا مرة واحدة.

أبواب المعامل يجب أن تكون مغلقة طوال الوقت.

التعامل مع الكيماويات المنتجة للأبخرة داخل المكان المخصص لذلك.

علامات التحذير يجب أن تعلق دائما فى المعامل.

٣-٢- احتياطات أو إرشادات خاصة بالأمان الحيوى للصوبات (البيوت الزجاجية)

- يجب أن تكون الصوب مغلقة دائما .
- درجة الأمان الحيوى وكود ورمز الأمان يجب ان يكون معلق على مدخل الصوبة .

- نظام التهويه يجب ألا يسمح بانتشار حبوب اللقاح أو الميكروبات المحورة وراثيا من الصوب .
- جميع أجزاء النبات سواء حية أو غير حية أو النباتات التى أدخلت فى الصوب عن التخلص منها يجب تعقيمها أولا أما إذا كانت ستخزن فيجب أن يكون التخزين فى أماكن أخرى مجهزة وفى هذه الحالة يجب مراعاة شروط الأمان وأثناء النقل .
- المياه الناتجة يجب أن تعالج كيميائيا قبل أن يتم تصريفها .
- يجب ارتداء الملابس الخاصة بالصوب طوال الوقت ويجب تعقيم هذه الملابس قبل الخروج من الصوب لأى سبب .
- يجب غسيل الأيدي قبل الدخول وعند الخروج من الصوب .
- وجود دواسة مغموسة فى مادة مطهرة عند مدخل الصوب .
- تسجيل يومى للتجارب التى تجرى فى الصوب .

٣-٣- احتياطات الأمان الحيوى فى التجارب النصف حقلية

- ممنوع إجراء التجارب الحقلية بواسطة آفات نباتية مستوردة وممرضة.
- يجب منع حبوب اللقاح الخاصة بالنبات من الانتشار عن طريق إزالة الزهور.
- يجب أن تغطى الزهور قبل النضج إذا كان هناك حاجة للزهور فى إقامة التجربة.
- تصميم مناسب للعزل يجب أن يقام بحيث يتجنب انتشار الزهور الى مناطق أخرى قريبة.
- ممنوع الدخول فى المناطق المعزولة لغير المسموح لهم .
- يجب أن تتخذ احتياطات خاصة للتأكد من عزل النبات أو أجزاء منه عند الحصاد .
- يجب أن يكون محمى من دخول الحيوانات والحشرات عن طريق عمل أسوار محيطة بالمكان .

تقييم الظروف البيئية

تقييم الظروف البيئية تمثل :

- النتائج العلمية والمعلومات الأخرى من الهيئات الحكومية قبل إصدارها للسماح للاختبارات الحقلية المحدودة والمرتبطة بالنباتات المهندسة وراثيا على أن تجرى فى نطاق اختبار ضيق .

- تقييم الظروف البيئية وتحليل النتائج للتأكد من أن المحاولة الحقلية ذات النطاق المحدود سوف لا تؤدى الى مخاطرة عند اجراءها وليس لها مغزى على نوعية البيئة البشرية .
- وذلك يتم تقييمه خلال ما يعرف بإيجاد صدمة ليس ذات أهمية . سوف تحدد ما إذا كـــان الســـماح يجب أن يصدر أو يمنح على عدة عوامل قليلة. وهناك مثال واضح فى المقطع رقم ٤ .

٤- النقط المحتواة المأخوذة فى الاعتبار

- هـــل الكائن الحى المهندس وراثيا له تأثير على المجتمعات النباتية معرض للخطر أو مهـــدد للكائن الحى والإنسان وصحة النبات والحيوانات وكذلك على المصادر الوراثية (مـــثال قابلية الأجناس الاقتصادية الهامة للمبيدات الزراعية أو المبيدات الحشرية ، أو الإنتاج الزراعى).
- ما هى معدلات إمكانية الحياة للكائنات المحور فى الحالات المتغيرة مثال وجودها فى المنطقة متحررة أو البيئة المحيطة .
- ما هى معدلات تكاثر الكائنات فى هذه المناطق ؟ ما هى مقدرة الكائنات على الانتشار من المنطقة المنتشرة منها ؟
- ما هى مقدرة الكائنات على الانتشار خارج المنطقة الموجودة بها ؟
- مـــا هى وسائل الانتشار ؟ وما هى العواقب الناتجة عن وجود هذه الكائنات فى البيئة بعد الخطة أو الوقت المخطط له ؟
- مـــا هـــى الطرق المستخدمة للتحكم أو التخلص من الميكروبات أو الكائنات الحية من المكان والبيئة المحيطة وهل هذا الإجراء مطلوب ؟ وما مقدرة أو كفاءة هذه الطرق ؟

النبات

انتشـــار الجينات المهندسة وراثيا بواسطة حبوب اللقاح هو أحد الاهتمامات الرئيسية آخذيـــن فـــى الاعتبار أن يكون التصميم التجريبى ومكانة وحالات الطقس كافية للحد من انتقال الجينات الى النباتات المتماثلة جنسياً .

الكائنات الحية الدقيقة المصاحبة مع النبات

هـل الكائـن الحى قادر ليعبر عن نفسه فى أو على النوع الغير مستهدف فى البيئة المحـيطة . الـى أى مـدى يمكـن للكائـن أن يعيش ويتكاثر على أو فى النبات المستهدف أو النباتات الأخرى فى المكان المختبر والبيئة المحيطة .

هـل الخصـائص المحـورة وراثيا يمكن أن تنتقل الى كائنات حية دقيقة أخرى فى البيئة.

هل هناك أى تأثير على الكائنات الحية الدقيقة بالتربة والتى تعتبر نافعة للنبات (مثال ذلك الرايزوبيوم وفطريات الميكوريزا) .

هـل تستطيع الكائنات الحية الدقيقة المهندسة وراثيا أن تنتشر بواسطة الرياح والماء والتربة والكائنات الحية المتحركة أو بطرق أخرى .

REFERENCES

Abel-Al, Z.E. (1994). The integration of biotechnology for sustainable agriculture and rural development into Arab countries. FAO, Near East Regional Office, Cairo, Egypt. pp. 1-63.

Anon, National Biological Impact Assessment Program (NBIAP) News Report. 1990-91-92-93-94-95. Information Systems Virginia Polytecyhnic Institute USA.

Compeau, G.C., W.D. Mahaffey and L. Patras, (1991). Full scale bioremediation of contaminated soil and water. Environmental Biotechnology for Waste Treatment, Plenum Press pp. 91-109.

Dowidar, A.M., A.F. Farag, A.H. Abdall, A.M. Ibrahim, ,.A. Tanan and M.A. Shaheen. (1994). Biology for Third Year Secondary p. 399.

Economidis, I. (1992). Biosafety research in the European Community: Results and prespectives. International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. pp. 135-140.

El-Nawawy, A.S. and M.H. El-Kattan (1994). The beneficial use of agricultural waste disposal in the Near East (Arabic). FAO Regional Office, Cairo, Egypt. p. 105.

Franklin, F.C.H. (1985). The impact of biotechnology on agriculture Biotechnology News. 5: 7.

Harlander, S.K. and R.G. Garner. (1986). The future of biotechnology in food processing. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 52-55.

Jong, S.C. and M.A. Birmingham. (1994). Fungi/yeast as transformation hosts for production of foreing proteins. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter 11 pp. 1-11.

Kearney, P.C. (1986). Soil microbes could help clean the environment. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 60-61.

Molina, F.I., L. Geletka, and S.C. Jong. (1995). High-resolution DNA fingerprinting of microorganisms at ATCC. American Type Culture Collection (ATCC) Quarterly Newsletter 1: pp. 103.

Papavizas, G.C. and J.E. Loper. (1986). Biotechnology and soilborne diseases. USDA Yearbook of Agriculture. pp. 62-65.

Rochelle, P.a. and B.H. Olson, (1992). Bacterial detoxification of mercury in sediment. International Sympsoium on the Biosafety

Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany, pp. 149-152.

Stotzky, G. (1992). Gene transfer among and ecological effects of genetically modified bacteria in soil. International Symposium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany. pp. 122-134.

Toet, D.A. (1992). Effect of rDNA technology on safety requirements for enzyme production and preparations. International sympsoium on the Biosafety Results of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Goslar, Germany pp. 201-203.

Wong, W.K.R., C.I. Curry, R.S. Parekh, M. Wayman, R.W. Davis, D.G. Kilburn and N. Skipper. (1988). Wood hydrolysis by Cellulomonas fini endonuclease and exoglucanase coexpressed as secreted enzyme in Saccharomyces cerevisiae Biotechnology, 6: pp. 713-719.

الباب التاسع

إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر

إنتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية في
معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية - مصر

بعد ان انتهيت من الأبواب الأساسية في هذا الكتاب تساءلت لماذا لا أشير الي الأنشطة البحثية في مجال المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية في مصر وكذلك الانتاج التجاري ان وجد. سألت اخي وزميلي الفاضل أ.د. مجدي مدكور وكيل مركز البحوث الزراعية وهو زميل عزيز اثري البحث العلمي في كليتي الزراعة جامعة الاسكندرية وكذلك جامعة عين شمس في مجالات الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية وترجمت ابحاثه لواقع ملموس ساهم ومازال في منظومة الادارة المتكاملة للافات بوسائل حيوية امنة اشهرها مستحضر "الاجرين" الذي يعتمد علي بكتريا الباسيلليس ثورينجنسيز بسلالات محلية غير مستوردة اصبحت تاخذ نصيبا من كميات المبيدات المستخدمة في مكافحة الافات خاصة علي المحاصيل التصديرية كالبطاطس وغيرها ناهيك عن القطن، ان ...... بنبذة عن خلقية وتطور انشاء وحدة بحوث الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية في معهد بحوث الهندسة الوراثية الذي شرف برئاسته لسنوات طويلة تحقق خلالها هذا الانجاز العلمي التجاري الكبير. حتي كتابة هذة السطور لم يسمح وقت زميلنا العزيز بتوفير هذة المعلومات. في نفس الوقت سألت نفس السؤال لاخي وزميلي العزيز د. حسن قاسم محمد نجيب رئيس وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية بمعهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية وقد تفضل سيادتة باعطائي تقرير بعنوان "استخدام المكافحة الحيوية للافات الزراعية في مصر" بتاريخ يوليو ٢٠٠٢ وهو تقرير شامل ووافي يقع في ٥٨ صفحة وقد سمح مشكورا ان استفيد به كاملا او في اجزاء توضع في هذا الكتاب. لقد زاد الكرم ودماثة الخلق من الزميل الكريم د. حسن قاسم من صعوبة موقفي واصبحت في حيرة من امري وتساءلت اليس هذا بالشئ الكثير؟ كانت الاجابة بالموافقة ولذلك اثرت ان استعين بالفقرات التي توضح نشاط الوحدة في المجال البحثي والانتاجي وكل من يريد مزيد من التفاصيل ان يتصل بالوحدة ومديرها العزيز. تناول التقرير اربعة محاور رئيسية يضم كل محور مجموعة من النقاط الهامة:

١. المحور الاول تناول الوضع الراهن لاستخدامات المكافحة الحيوية في مصر.
٢. المحور الثاني تناول الانجازات والتطبيقات الناجحة للمكافحة الحيوية في مصر.

٣. المحـــور الثالث تناول المشاكل والمعوقات التي تواجة استخدام المكافحة الحيوية في مصر.
٤. المحور الرابع تناول المقترح التطويري لاستخدام المكافحة الحيوية في الحد من تلوث البيئة في مصر.

بعـد ان استعرض التقرير وضع الافات وما تحدثة من فقد في الانتاج الزراعي مما يستدعي ضـرورة السـيطرة عليها ومكافحتها بكل الوسائل الممكنة في منظومة متكاملة مدروسـة العناصر والمحددات بما فيها المبيدات تمت الاشارة الي اهم المشاكل التي حدثت بسـبب الاسـتخدام المكـثف غير العقلاني للمبيدات في عمليات مكافحة الافات بداية من مقاومـة الافـات لفعـل المبـيدات، التاثير علي للأعداء الحيوية، التاثير علي الحشرات الاقتصـادية، التاثير علي الحيوانات الاليفة وتلوث المنتجات، التاثير علي الانسان، التاثير علـي الـثروة السمكية وكائنات التربة النافعة، التاثير علي الطيور البرية والثدييات. اشار الـتقرير كذلـك الـي خطورة وضع مخلفات المبيدات في المنتجات الزراعية سواء التي تستخدم مباشرة او بغرض التصنيع وهي اعلي من حدود الامان التي تم تحديدها من خلال اللجـان المشـتركة من منظمة الاغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية WHO/FAO والتي نصت علي التوصية بالحد الاقصي للمخلفات ٢ مللجم/كجم$^{-١}$ المدي الواسع من السلع الغذائـية المحتوية علي المبيدات مع تناول يومي من ٠,٠٠٢ وحتي ٠,٢ مللجم/كجم$^{-١}$ من وزن الجسم. اشار التقرير كذلك الي الاسس التي تضمنتها اتفاقية التجارة العالمية بضرورة الحـد مـن اسـتخدام المبيدات وتقليل التلوث البيئي بها فضلا عن الحصول علي منتجات زراعـية خالـية مـن المبـيدات بما يتمشي مع قواعد منظمة التجارة العالمية Worled Trade/Organization (WTO) بشأن انتاج وتداول وتصدير الحاصلات الزراعية بين الـدول والـذي ادي بكثير من الدول الي الاتجاه الي الزراعة الحيوية. بخصوص تصدير الحاصـلات الزراعية بين الدول كان لابد علي وزارة الزراعة المصرية ان تتخذ خطوات فعالة نحو ترشيد استخدام المبيدات من خلال برامج المكافحة المتكاملة Integrated Pest Management (IPM) مع الاهتمام بالعمليات الزراعية الاخري والتقاوي المنتقاه وانتاج النباتات المهندسة وراثيا الذي تغير علي اساسة مفهوم المكافحة المتكاملة الي مفهوم سياسة ادارة المحاصيل الزراعية المتكاملة Integrated Crop Management (ICM) والذي اصـبحت فـية عناصـر المكافحـة الحيوية حجر الزاوية Corner Stone مع العمليات الزراعـية وانتخاب النباتات المقاومة والمهندسة وراثيا – ومع ظهور العديد من المبيدات

الحيوية فضلا عن التنافس المستمر في تطوير التكنولوجيا في هذا المجال من حيث الانتاج والتربية ومراقبة الجودة وظروف التخزين والتطبيق مع تقدم تكنولوجيا المعلومات الخاصة بـتلك المبيدات فان الحاجة ملحة لتوفر النظام الخاص بانتاج وتسجيل وتداول تلك المبيدات علـي اسس علمية تحت الظروف المصرية حتي يمكن تجنب اية مخاطر قد تنتج عن تلك المبـيدات فـي المستقبل – ولقد كانت مصر من الدول الرائدة في هذا المجال حيث منعت وزارة الـزراعة المصرية استخدام المبيدات في العديد من محافظات الدلتا كالفيوم والوادي الجديد والاسماعيلية والمناطق الحديثة الاستصلاح مثل توشكي والعوينات الامر الذي ادي الـي تعاظم خبرات مكافحة الافات .. بالاضافة الي ذلك اتخذت مصر العديد من الخطوات الهامة في مجال ترشيد استخدام المبيدات من اهمها:

أ- مجال تسجيل وتداول المبيدات

أولا: المبيدات الكيماوية

صـدر القرار الوزاري رقم ٦٦٣ لسنة ١٩٩٨ طبقا لقانون الزراعة رقم ٥٣ لسنة ١٩٦٦ حيـث تـناول هـذا القرار طريقة الحصول علي ترخيص بتشغيل مصنع مبيدات زراعـية او غيرها، حيث انه لابد من الحصول علي موافقة هيئة التصنيع – موافقة جهاز الامـن الصـناعي – موافقـة جهاز شئون البيئة – موافقة وزارة الصحة عن مدي توافر الاسـتعدادات المطلوبـة لحمايـة العاملين واعتماد نظام الفحص الدوري للعاملين – سجل تجـاري مدون به غرض تصنيع المبيدات – رسم هندسي للمصنع – بيان القوي المحركة للمصـنع – بـيان الاجهـزة الموجودة واماكنها – ترخيص من الوحدة المحلية الواقع في دائرتها المصنع – بيان من اللجان الرسمية المنوطة بالمبيدات يتضمن المواد المسجلة التي يـتم تصنيعها في المصنع – اقرار بعدم تداول أي تصنيع أي من المبيدات المنتجة الا بعد اجـراء التحاليل اللازمة للتحقق من مطابقة المبيد المسجل عليها طبقا للمادة ١٤ من القرار الـوزاري المشـار الـيه – اجراء اختبارات السمية البيئية الحادة والمزمنة والتاثير علي الاعـداء الحـيوية وكائـنات الـتربة الدقيقة حتي يتم تصنيف المركب علي حسب درجة خطورته علي الانسان والبيئة المحيطة به وكذلك احتياطيات السلامة للمستخدم ضد التسمم وتلوث السلع الزراعية والبيئة كما قسمت المبيدات الكيماوية الي خمسة مجموعات بناءا علي الخطـواط الارشادية لهيئة وكالة حماية البيئة الامريكية Environmental Protection Agency (EPA) التالية حسب درجة خطورتها بحيث يجب ان تكون المبيدات التي تسجل في مصر تنتمي للمجموعة (D) المصنفة علي انها غير مسرطنة للانسان او المجموعة (E) التي لا يوجد دليل علي انها مسرطنة للانسان.

ثانيا: المبيدات الحيوية

بالنسبة للكائنات الممرضة والمركبات الحيوية المستخدمة في برنامج المكافحة الحيوية في مصر فانها تتبع للمجموعات التي قسمت بواسطة وكالة حماية البيئة الامريكية Environmental Protection Agency (EPA, 2001) والتي تضم ثلاث مجموعات رئيسية هي:

١. المبيدات الميكروبية Microial Pesticides.
٢. المبيدات الكيميائية الحيوية Biochemical insecticides.
٣. النباتات التي تحتوي علي مواد واقية Plant-Incorporated Protectant (PIP)

١- المبيدات الميكروبية

تعريف المبيد الحيوي الميكروبي: أي مستحضر يحتوي علي احد الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا والطحالب والفطريات والفيروسات او النيماتودا (حيوانات اولية) في صورة نشطة او ساكنة (او اجزاء من الميكروب – متجرثمة) سواء كانت منفردة او مخلوطة معا وتنتج سموم داخلية او خارجية ذات تاثيرات غير ضارة للانسان او الحيوان او الطيور والاعداء الحيوية للافات من الطفيليات والمفترسات وكذلك الحشرات النافعة – وتستخدم في مكافحة الافات التي تصيب المحاصيل الزراعية سواء في الحقل او في المخزن. ينطبق هذا التعريف علي المبيدات التي تحتوي علي كائنات ميكروبية معدلة وراثيا من خلال الانتخاب الطبيعي او التي بها تعديل في جيناتها الوراثية.

٢- المبيدات الكيميائية الحيوية

تعريف المبيدات الكيميائية الحيوية: هي تلك المبيدات التي تكون فيها المادة الفعالة من مصدر طبيعي مثل الفرمونات والهرمونات ومنظمات النمو الحشري والنباتية والمادة الطاردة والانزيمات وبعض المواد الاخري الموضحة.

٣- النباتات التي تحتوي علي مواد واقية

يقصد بها النباتات المهندسة وراثيا والتي تحتوي علي الجينات المسئولة عن انتاج المواد السامة للكائنات الميكروبية وحتي الان مازالت تلك النوعية من النباتات في مصر

محـــل اختـــبار من حيث تاثيراتها السامة للافات وكذلك الدراسات الخاصة بدرجة الامان الحيوي لها بالنسبة للبيئة لم تكتمل بعد وتحتاج الي بعض الوقت.

عموما بالنسبة للمركبات الحيوية نجد ان عدد المركبات الحيوية المعروفة والمسجلة فـــي العـــالم وصـــل الي حولي ١٨٨ مركب تشمل المبيدات الميكروبية (بكتريا – فطر – فيروســـات – نيماتودا)، والفرمونات الجاذبة الجنسية، والمستخلصات النباتية تنتجها حوالي ٢٤٥ شركة سواء شركات اساسية او فروع منها وقد واكبت مصر التقدم العالمي في مجال المركبات الحيوية واهتمت بها حيث سجل في مصر حوالي ٢٢ مركب سواء المنتجة محليا او المســـتوردة كما هو موضح بالجدول رقم (٩ــ١)، واما عن استخدامات هذة المركبات فهـــي تســـتخدم في العديد من المحاصيل ضد الحشرات والاكاروسات حيث ادخلت ضمن بـــرامج المكافحة المتكاملة للافات في محاصيل الحقل والخضر والفاكهة والنباتات الطبية والعطرية.

جدول (٩ــ١): المركبات الحيوية المسجلة وتحت التسجيل في مصر حتي عام ٢٠٠٢

اسم المركب	صورته وتركيزه	المجموعة التابع لها	رقم التسجيل	الاستخدام
المبيدات الميكروبية البكتيرية				
اجرين	٦,٥% مسحوق	B. thuringiensis	٥٨٠	مبيد حشري
ايكوتك-بيو	١٠% مسحوق	B. thuringiensis	٥١٩	مبيد حشري
بروتكتو	١٠% مسحوق	B. thuringiensis	٥٤١	مبيد حشري
دايبل-X٢	٦,٤% مسحوق	B. thuringiensis	٥١٠	مبيد حشري
زنتاري	٣% مسحوق	B. thuringiensis	٥٦٩	مبيد حشري
ريزو-ان	٣٠ مليون جرثومة/جرام	B. subtilus	٥٧٠	مبيد فطري
المبيدات الميكروبية الفطرية				
بيو-فلاي	٣٠ مليون جرثومة/جرام	B. bassiana	٥٣٤	مبيد حشري
بيوسكت	٣٢ مليون جرثومة/جرام	B. bassiana	تحت التسجيل	مبيد حشري
بيوكانزا	٣٢ مليون جرثومة/جرام	B. bassiana	تحت التسجيل	مبيد حشري
بالانتا جارد	٣٠ مليون جرثومة/جرام	Trichoderma	تحت التسجيل	مبيد فطري
المبيدات الميكروبية البيوكيماوية				
الفرتميك	١,٨% مستحلب	ابامكتين	٤٦٦	مبيد اكاروسي
اسبينوساد	١,٨% مستحلب		تحت التسجيل	مبيد اكاروسي
الزيوت الطبيعية والمستخلصات النباتية				
زيت طبيعي	٩٥% مستحلب	زيت فول الصويا	٥٢٨	مبيد حشري
نات - ١	٩٦% مستحلب	زيت فول الصويا	٦٥١	مبيد حشري
تريولوجي	٩٠% مستحلب	زيت النيم	٦٣١	مبيد حشري
نيمكس	٤,٥% مستحلب	زيت النيم	٦٢٧	مبيد حشري
الزيوت المعدنية				
البيوم	٨٠% مستحلب	زيت معدني	١٧٦	مبيد حشري

تابع جدول (٩-١): المركبات الحيوية المسجلة وتحت التسجيل في مصر حتي عام ٢٠٠٢

المركب	صورته وتركيزه	مجموعته	سنة التسجيل	الاستخدام
كيمي - اويل	٨٠% مستحلب	زيت معدني	٦٨٤	مبيد حشري
كيموسول	٩٥% مستحلب	زيت معدني	٥٤٨	مبيد حشري
مصرونا	٨٥% مستحلب	زيت معدني	٢٣٦	مبيد حشري
سوبر مصرونا	٣٤% مستحلب	زت معدني	٢٣٧	مبيد حشري
زيت رويال	٨٢% مستحلب	زيت معدني	٨٠	مبيد حشري
زيت ناشيونال	٧٥% مستحلب	زيت معدني	٥٤٩	مبيد حشري
زيت الفولك	٨٢% مستحلب	زيت معدني	٢٧٩	مبيد حشري
كزد-اويل	٩٥% مستحلب	زيت معدني	١٧٤	مبيد حشري

ب- مجال تحليل متبقيات المبيدات

أنشأت وزارة الزراعة المعمل المركزي لتحليل متبقيات المبيدات والعناصر الثقيلة في عام ١٩٩٥ بالقرار الوزاري رقم ٦٨٠ لسنة ١٩٩٥ الذي يخول له اصدار شهادات رسمية بالتحاليل التي يجريها باعتباره المعمل الرسمي لوزارة الزراعة بالنسبة لهذة التحاليل. من القواعد الاساسية لانشاء هذا المعمل هو ما يلي:-

١. حماية المستهلك
٢. حماية الصادرات وتشجيعها
٣. مراقبة الواردات

لقد حصل المعمل علي شهادة الاعتماد الدولي Accreditation Certificate من الفرع الفنلندي للمركز الاوروبي لاعتماد المعامل FINAS-EAL وذلك في عام ١٩٩٦ والتي جددت حتي عام ٢٠٠٤ ويطبق المعمل نظام Iso-17025 ووصل عدد العينات التي تم تحليلها في المعمل الي ١٧ الف عينة في عام ٢٠٠١. بالاضافة الي تحليل العينات يقوم العمل بتدريب الكوادر الفنية في مجال تحليل متبقيات المبيدات

جـ- مجال مكافحة الافات

عملت وزارة الزراعة والباحثين في مجال وقاية النباتات علي ادخال وسائل اخري غير قاتلة تحت مسميات البدائل او الاقترابات الحديثة في السيطرة علي الافات تحت مظلة

الادارة المتكاملة للافات (IPM) في مصر ، حيث حدد الانتشار الموسمي للعديد من الافات الاقتصادية مثل دودة اللوز القرنفلية والشوكية ودودة ورق القطن ...الخ وعلاقة تعداد تلك الافـــات بالظـــروف المناخـــية لمعرفة اكثر الاجيال خطورة من خلال الوحدات الحرارية Heat Units ولهـــذا انشأت وزارة الزراعة بالمعاهد البحثية المختلفة العديدة من الوحدات ذات الطـــابع الخاص التي تستطيع ان تقوم بدور بحثي وانتاجي بما يخدم النواحي التطبيقية فـــي مجـــال مكافحة الافات والامراض من التعاون مع الاجهزة التنفيذية بالمحافظات حتي يسهل نقل النتائج المعملية الي ارض الواقع مما يمكن المزارع من المتابعة المستمرة لنتائج تطبـــيق تلـــك الـــبحوث ... فعلـــي سبيل المثال في معهد بحوث وقاية النباتات العديد من الوحدات مثل وحدة انتاج الفرمونات، وحدة انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية، وحدة مكافحة النمل الابيض، وحدة تحليل الفرمونات، وغيرها من الوحدات، ولمعرفة تاثير الظـــروف البيئـــية علـــي التعداد الحشري لمجموع الافات انشات وزارة الزراعة محطات الارصـــاد الجويـــة الزراعية في أماكن عديدة من محافظات مصر لتمد الباحثين بالبيانات المطلوبة عن العوامل المناخية من الحرارة والرطوبة وعدد ساعات سطوع الشمس والقمر لما لها من اثر ليس فقط علي النشاط البيولوجي للحشرات ولكن في معدل انتشار الامراض النباتـــية ولقـــد انعكس اثر ذلك علي معدل استخدام المبيدات الحشرية والفطرية في مصر حيـــث خفض استهلاك المبيدات من ٣٠ الف طن متري في التسعينات الي ثلاثة الاف طن مـــتري حيـــث اعـــتمدت برامج المكافحة علي العديد من العناصر المتكاملة مثل العمليات الزراعية والفرمونات الجاذبة الجنسية واستخدام المبيدات الميكروبية كما يلي:-

١ـــ استخدام الفرمونات

وجـــد ان الحشرات تفرز بعض المواد التي تلعب دورا هاما في عملية التزاوج بين افـــراد الـــنوع الواحد اطلق عليها بالفرمونات الجنسية Sex pheromone ، فعند اطلاق الانـــاث للفـــرمون ومـــن خلال مستقبلات الحس الكيماوية الموجودة علي قرون استشعار الذكـــور تتجة الذكور الي الاناث لتتم عملية التزاوج لتضع الاناث بيضا مخصبا يفقس الي يـــرقات وتكمل دورة حياة الحشرة. يتم استخدام الفرمونات الجاذبة الجنسية في الاغراض التالية:

- التنبؤ بتعداد الافة Monitoring
- الانذار المبكر بالاضرار الناتجة عن الافات
- حصر مناطق انتشار الافات
- عمليات الحجر الصحي:

تعتبر مصر من البلدان الرائدة في الاستخدام الموسع للجاذبات الجنسية "الفرمونات" في مجال استكشاف تواجد الافات والتنبؤ بظهورها في حقول القطن والعنب والبطاطس وذبابة الفاكهة وكذلك في مجال المكافحة عن طريق احداث خلل في نظام التقاء الذكور والاناث لدودة اللوز القرنفلية ودودة اللوز الشوكية وغيرها.

نظرا لاهمية استخدام الفرمونات الجاذبة الجنسية في التنبؤ بتعداد الافات باستخدام المصائد الجاذبة الجنسية ونظرا لارتفاع سعر كبسولة الفرمون المستوردة تم انشاء وحدة انتاج كبسولات الجاذبات الجنسية بالقرار الوزاري رقم ١٤٣ لسنة ١٩٩٥ ، حيث تقوم هذة الوحدة بانتاج كبسولات الفرمونات الجاذبة الجنسية للافات الاقتصادية لاستخدامها في التنبؤ بالكثافة العددية او في تحديد ميعاد الرش سواء بالمركبات الحيوية او المبيدات الكيميائية التقليدية وقد بلغ الانتاج الاجمالي من كبسولات الفرمونات الجاذبة الجنسية الي حوالي ٢٩ مليون كبسولة خلال الفترة من ١٩٩٣ وحتي ١٩٩٩.

٢ـ استخدام الكائنات الميكروبية في مكافحة الافات

نظرا لان اتجاه وزارة الزراعة هو ترشيد استخدام المبيدات في محاصيل الحقل والخضر والفاكهة فان استخدام الكائنات الميكروبية من بكتريا وفطريات وفيروسات سوف يلعب دورا هاما في الاقلال من استخدام المبيدات لما تمتاز به من التخصص الشديد تجاه عوائلها فقط وعدم الاضرار بالحشرات النافعة قد دفع بجذب الاهتمام بها وادخالها ضمن منظومة المكافحة المتكاملة للافات في مصر، ولقد استعملت العديد من المسببات المرضية للافات لسنوات عديدة وفي مناطق مختلفة من العالم دونما توضيح ثمة تاثير بيئي غير مرغوب فيه، وبالرغم من تلك الحقيقة والكم الهائل من البحوث المتعلقة بهذا المجال في مصر لم تاخذ المبيدات الميكروبية طريقها الي السوق التجاري نظرا لان مسطرة تقييم تلك المبيدات في البداية كانت تعتمد علي الابادة الفورية والتي تعتبر منخفضة بالمقارنة بالمبيدات الحشرية التقليدية وبالتالي كان الاقبال علي استعمالها ان لم مستبعدا فهو محدود للغاية حتي بداية التسعينات، ومع تغير اسلوب مكافحة الافات والتي تعتمد علي جميع الوسائل المتاحة للحد من تعداد الافات والاهتمام بالتاثيرات المتاخرة للمسببات المرضية اعيدت بل وتاكدت الرغبة في استخدام المسببات الميكروبية في مكافحة العديد من الافات.

لذلك كان من الضروري انشاء وحدة انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفيروسية حتي يمكن تطوير البحوث والانتاج الخاص بتلك الكائنات لاستخدامها في مكافحة الافات حيث وجد أن استخدام المركبات التجارية من بكتريا Bacillus thuringiensis فضلا عن انها غالبا ما تكون مكلفة وعند استخدامها في مكافحة الافات تحت الظروف المصرية

تختلف فيها النتائج المعملية عن النتائج الحقلية وذلك لان الخواص الطبيعية للمنتج التجاري لا تتمشـــي مع ظروف البيئة المصرية حيث ان الاشعة الفوق بنفسجية تلعب دورا هاما في قـــتل الجراثـــيم الحية الموجودة في المستحضر والتي يعزي اليها التاثير السام للبكتريا فان تحســـين الخواص الطبيعية للمنتج النهائي سوف تساعد كثيرا في زيادة مدة فعالية المركب اثناء التطبيق الحقلي – لذلك كان الهدف من انشاء الوحدة:

١- انتاج المبيدات الميكروبية البكتيرية والفطرية.

٢- تحسين صورة المنتج المستخدم في التطبيق الحقلي حتي يتمشي مع ظروف البيئة المصرية مع مراعاة اقل التكاليف مقارنة بالمنتج التجاري المستورد.

٣- البحـــث عـــن ســـلالات جديـــدة فـــي الـــتربة المصرية من بكتريا Bacillus thuringiensis وكذلك الفيروسات والفطريات الممرضة للافات والتي قد تكون فعاليتها علي الافات تفوق فعالية السلالات التجارية.

٤- الحد من استخدام المبيدات وتقيل الاخطار الناجمة عنها سواء للانسان او ممتلكاته.

٥- فـــتح الاسواق التصديرية للمنتجات الزراعية المصرية وذلك لخلوها من متبقيات المبيدات وبالتالي العملات الاجنبية التي تدعم الاقتصاد القومي.

فـــي النهاية فان الاعتماد علي الخبرات العلمية بالمعهد في هذا المجال الحيوي الهام والذي سوف يساعد في حل مشكلة العديد من الافات سوف يؤدي الي ما ياتي:

١- زيادة انتاجية المحاصيل الزراعية كما ونوعا وتقليل الفاقد الناتج عن الافات سواء قـــبل او بعـــد الحصـــاد مما يؤدي الي تقليل الفجوة بين الانتاج والزيادة السكانية المستمرة.

٢- زيادة العملات الصعبة نتيجة تصدير المنتجات الزراعية الخالية من المبيدات وفتح اسواق جديدة امام المنتجات الزراعية المصرية.

٣- تقلـــيل معدل استخدام المبيدات في مكافحة الافات وبالتالي تقليل الاخطار الصحية التي يتعرض لها الانسان.

٤- الكشف عن السلالات الجديدة من البكتريا والفيروسات والفطريات والتي قد تفوق في قدرتها السلالات التجارية المعروفة والتي من الممكن ان تكون ذات تخصص شديد في مكافحة العديد من الافات.

الانشطة البحثية لوحدة انتاج المبيدات الميكروبية

أولا: عزل المسببات المرضية الحشرية Entomopathogens isolation

١ـ البكتريا الممرضة للحشرات:

تتبع البكتريا المستخدمة في مكافحة الافات البكتريا العصوية Bacilli ومنها بكتريا Bacillus thuringiensis التي تحتوي علي العديد من الانواع مثل B. thuringiensis kurstaki, aizawa, entomocidus, israelensis, thuringiensis وغيرها من الانواع وتنتج هذة البكتريا انواع مختلفة من البروتينات السامة والتي يطلق عليها الدلتا اندوتوكسين –endotoxin والذي يعمل كسم معدي متخصص علي اليرقات – فعند تغذية اليرقات علي النباتات المعاملة تتوقف اليرقات عن التغذية ثم يحدث تحطيم للخلايا الطلائية للمعي الاوسط في اليرقات نتيجة انتفاخها وانبعاجها ثم تموت اليرقات ويزداد التاثير السام للبروتكتو علي العمرين الاول والثاني، كما يحدث تاثيرات متاخرة مثل فشل اليرقات في التعذير وتشوه العذاري والفراشات الناتجة من تغذية اليرقات علي النباتات المعاملة وكذلك تضع الاناث بيض غير مخصب لا يفقس. ترتبط درجة تخصص البروتين للافات طبقا لتركيبها الكيماوي ومدي تلائم تلك البروتينات مع الفتحات الموجودة بشعيرات الخلايا الطلائية المبطنة للمعي الاوسط لليرقات ومدي توفر درجة الحموضة المناسبة بمعدة اليرقة – وتنتج بعض انواع البكتريا مثل B. thuringiensis نوع اخر من المواد السامة – exotoxin والذي يمتاز بسميته العالية للافات وتاثيراته الضارة للانسان ولذلك يمنع استخدام السلالات المنتجة لهذا التوكسين.

تم عزل العديد من سلالات بكتريا الباسيلس التي كان من اهمها سلالة بكتريا Bacillus thuringiensis kurstaki التي تستخدم في مكافحة العديد من الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة B.t israelensis التي تستخدم في مكافحة البعوض والعديد من السلالات الاخري الفعالة ضد بعض الافات ذات الاهمية الاقتصادية .... هذا وقد تم انتاج وتطوير المركب الحيوي "بروتكتو" الذي يحتوي علي B.t kurstaki في صورة مسحوق قابل للبلل يحتوي علي ٢٣٠٠٠ جرثومة حية لكل ملليجرام ومسجل بوزارة الزراعة تحت رقم ٥٤١ لسنة ١٩٩٧.

٢ـ الفيروسات الممرضة للحشرات:

- فيروس فراشة درنات البطاطس (فيروتكتو)

بالـــتعاون بين معهد بحوث وقاية النباتات (وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروســية) والمركز الدولي للبطاطس تم انشاء عدد ٤ معامل لانتاج الفيروس المحبـــب لفراشة درنات البطاطس بمحافظات الغربية والبحيرة باعتبارها من اهم محافظات زراعة البطاطس بمصر هذا بالاضافة الي المعمل الاصلي بمعهد وقاية النباتات.

- فيروس دودة ورق القطن البوليهدروسيس النووي (فيروست)

يتم انتاج هذا الفيروس بمعهد بحوث وقاية النباتات في صورة مسحوق قابل للبلل ٤%. تـــم خلطــــة مع البكتريا ويتم اختباره هذا العام ايضا ضد دودة ورق القطن تحت الاسم التجاري "بروفيكت".

٣ـــ بالنسبة للفطريات الممرضة لحشرات:

تـــم عزل العديد من المسببات المرضية الفطرية فعلي سبيل المثال تم عزل فطري Metarihizium anisoplae & Metarihizium flavoridae مـــن الحشـــرات الكاملة المريضة والميتة لسوسة النخل الحمراء وتم تعريفها.

كـــم تم عزل فطري Beauvaria Bassiana & Beauvaria brongniartii التي تســتخدم في مكافحة الذبابة البيضاء والمن والجاسيد – وتم تطوير صورة المنتج التجاري لتلك الفطريات وادرجت ضمن برامج وزارة الزراعة للموسم التجريبي ٢٠٠١ لاستخدامها في مكافحةِ الذبابة البيضاء والاكاروس في العديد من محاصيل الحقل والخضر.

ثانيا: استخدام التكنولوجيا الحيوية في دراسة خواص المسببات المرضية

لدراســـة الخـــواص المختلفة لممرضـات الحشرات (بكتريا – فطريات – فيروسات) تستخدم الطرق التالية من خلال:

١. تطويـــر طـــرق التقـــيم المناعـــي Enzyme linked immunosrbant assay (ELISA).
٢. دراسة البروتين من خلال التفريد الاليكتروليتي Gel electrophoresis.
٣. تفـــاعل البلمرة Polymerase chain reaction (PCR) وعمل الخريطة الوراثية للجينات المسئولة عن انتاج المادة السامة (البصمة الوراثية Gene mapping).

ثالثا: الانتاج الكمي لممرضات الافات الحشرية

بالنسبة للبكتريا والفطريات تم دراسة تاثير مصادر مختلفة من البروتينات والكربوهيدرات والاملاح المعدنية والفيتامينات ودرجة الحموضة والحرارة وثاني اكسيد الكربون والاكسيجين وتحديد انسب البيئات التي تتوفر بالبيئة المصرية بارخص التكاليف حتي يمكن تخفيض قيمة المنتج النهائي.

بالنسبة للفيروسات فيلزم الاعتماد علي العائل الاساسي للفيروس وهو الافة ولذلك لابد من تاسيس معامل لتربية الافة باعداد كبيرة ثم استخدام الطور المناسب للعدوي وهو اليرقة في انتاج الفيروس – ففي حالة فيروس فراشة درنات البطاطس تم تاسيس ٥ وحدات لانتاج الفيروس تحتوي الوحدة علي معملين لاكثار فراشة درنات البطاطس ومعمل لاكثار الفيروس وذلك بنواحي الغربية والبحيرة بطنطا وكفر الزيات والمركز الدولي للبطاطس باعتبارها محافظات اساسية في انتاج البطاطس بالاضافة الي المعمل الاساسي بالقاهرة – وتختص تلك المعامل بانتاج اليرقات المصابة بالفيروس وتجميعها بمعمل وقاية النباتات الذي يقوم بتجهيزها في صورتها النهائية للمزارع (جدول ٩ــ٢).

خلال الفترة من ١٩٩٥ حتي ٢٠٠١ قامت وحدة انتاج المبيدات الحيوية البكتيرية والفيروسية بانتاج وتطوير العديد من المركبات التي سجل بعضا منها بعد اجراء كافة الدراسات البيئية والفعالية عليها مثل الفيروتكتو والبروتكتو ولازال البعض الاخر تحت الاختبار كما هو موضح بالجدول رقم (٩ــ٣).

جدول (٩ــ٢): عدد المتدربين والكميات المنتجة من الفيروس والبكتريا والفرمونات الجاذبة الجنسية لفراشة درنات البطاطس المنتجة واستخداماتها خلال موسم ٢٠٠١

Trainees	Partici-pants No.	Production of Bt+ & G.V		Application of Bt+&G.V.			
				Field (feddan)		Storage (ton)	
Agronomist Visitors Farmers	29 5 1500	G.V.* B.t. Pheromone	2 Milon 300 kg 250.000	B.t. G.V. Pheromone	300 20 5.000	B.t. G.V -	4000 4000 -

- *infected larvae with granulosis virus*

جـدول (٩-٣): المركبات الحيوية التي تم انتاجها بوحدة انتاج المبيدات الحيوية - معهد بحوث وقاية النباتات.

الاسم التجاري	صورته وتركيزه %	الاسم الشائع للمركب	المحصول	الآفة
بروتكتو	23X10^{6} IU/mg w.p.	B. thuringiensis kurstaki	بطاطس	فراشة الدرنات
فيروتكتو	٤% مسحوق قابل للبلل	Granulosis virus	بطاطس	فراشة الدرنات
بروتكتو	23X10^{6} IU/mg w.p.	B. thuringiensis kurstaki	قطن	دودة القطن
فيروست	w.p. %٤	Nuclear polyhedrosis virus	قطن	دودة القطن
بروفيكت	w.p. %٥٠+٥٠	B.t. + NPV	قطن	دودة القطن
بيوفار	23X10^{6} IU/mg w.p.	Beauvaria bassiana	كوسة	ذبابة بيضاء
بيورانزا	23X10^{6} IU/mg w.p.	Metarihizium anisoplae	خيار	أكاروس

رابعا: تجهيز المنتج التجاري

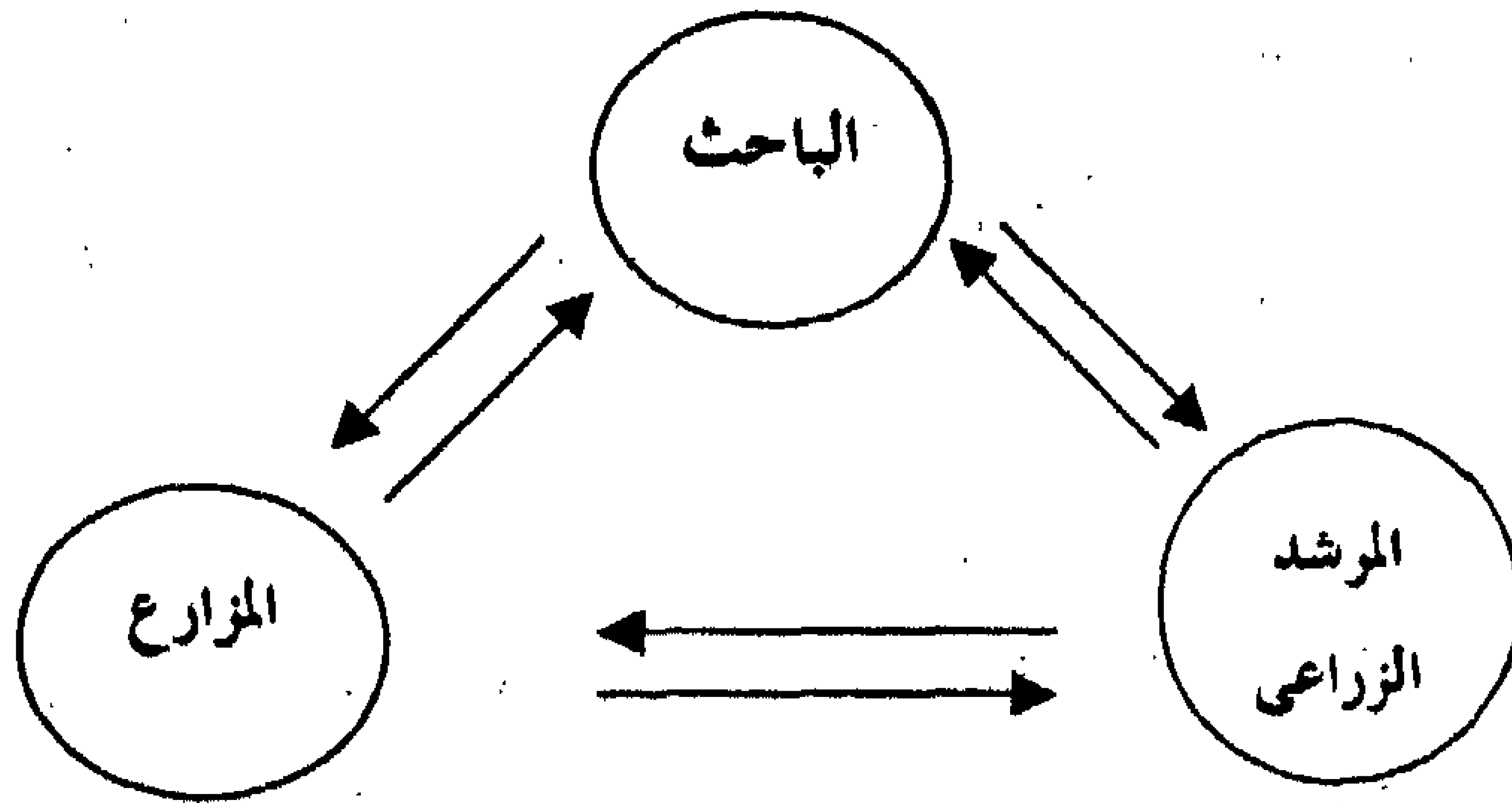
يتم تجهيز المنتج التجاري كي يصبح في صورة مناسبة وسهلة الاستخدام للمزارع - حيث يتم التجفيف بالتبريد تحت ضغط ثم اضافة المواد المحسنة كالمواد المبللة والحاملة والناشرة والواقية من اشعة الشمس.

مراقبة الجودة تتم من خلال عد جراثيم البكتريا والفطريات او جزيئات الفيروس سواء بالشريحة الميكرومترية او باستخدام طريقة الاليزا. ثم يعبأ المنتج في عبوات تتمشي مع احتياجات المزارعين. كما يتم اجراء اختبارات الامان الحيوي للمنتج بالتعاون مع المختصين في اختبار سمية المبيدات بالمعمل المركزي للمبيدات من حيث التاثير علي وظائف الكبد والكلي والانزيمات والبروتينات وغيرها من اختبارات الامان الحيوي.

د- الاهتمام بالوعي التثقيفي الزراعي (الارشاد الزراعي)

اهتمت وزارة الزراعة بالتعاون مع وزارة التعاون الدولي بالاعلام الزراعي الموجة سـواء مـن خلال الاذاعة والتليفزيون ببث البرامج الاذاعية التي تقدم الخدمات الارشادية للمزارعيـن المصـريين كمـا هو الحال في برنامج صباح الخير يامصر او برنامج سر الارض التـي تقـدم المعلومات العلمية لادارة الزراعة بطريقة سهلة ومبسطة – كما تقدم الجـرائد والصـحف المعلومـات الحديثة عن المجالات المختلفة في الزراعة كما هو في صـفحة مصر الخضراء بجريدة الاهرام والمجلة الزراعية وجريدة التعاون وبذلك يصبح المـزارعون علـي علـم ودرايـة بكل ما هو جديد في مجال الانتاج ومكافحة الحشرات والامراض.

لـم يقتصـر دور وزارة الـزراعة علي الاعلام بل زاد الاهتمام بالجانب التدريبي لمهندسي الارشاد الزراعي والعاملين في مجال وقاية النباتات في المحافظات المختلفة عن طريق الباحثين المختصين وذلك لرفع كفاءة المتدربين في مجال ترشيد استخدام باعتبارهم حلقة الوصل بين العاملين في مجال البحوث والمزارعين ، بل تخطي التدريب الي مستوي المزارعين من خلال المدارس الحقلية Farmer field school (FFS) علي ارض الواقع حتي يمكن للزراع التعرف علي الافات وكيفية علاجها.



شـكل (٩ـ١): نظـام الارشـاد بالمشـاركة لنقل تكنولوجيا المكافحة البيولوجية للافات الزراعية

هـ– الاهـتمام بالمشاريع البحثية والوحدات البحثية التي تعتمد علي وسائل المكافحة البيولوجية

تـنفق مصـر بالتعاون مع المنظمات الدولية مثل المنظمة العربية للتنمية الزراعية والحكومـية الامريكية وهيئة المعونة الغذائية الفرنسية وغيرها من منظمات ما يقرب من

٢٠٠ مليون جنيه علي المشاريع البحثية التي تهتم بتطوير اساليب المكافحة البيولوجية للافات الزراعية مثل مشروع المكافحة البيولوجية لفراشة درنات البطاطس ، ومشروع اسد المن ، مشروع ابو العيد ومشروع ذبابة الفاكهة ومشروع النيماتودا الممرضة للحشرات وفيروس دودة القطن ومشروع سوسة النخيل الحمراء بالاضافة الي العديد من المشروعات البحثية في مجال الامراض ومكافحة الحشائش.

و- تعاون مصر مع المنظمة العربية للتنمية الزراعية التابعة لجامعة الدول العربية في العديد من المشاريع البحثية للحد من المبيدات:

حيث لعبت مصر دورا هاما في عقد الندوة القومية للخبراء العرب في مجال المبيدات ووقاية النباتات في الفترة من ١٢-١٤ يونيو ١٩٩٤ لمناقشة اوراق العمل الخاصة بوقاية النباتات وترشيد استخدام المبيدات والاضرار الناجمة عنها.

*** دور القطاع الخاص في مجال المكافحة الحيوية**

نظرا للتقدم الهائل في الزراعة المصرية خلال السنوات السابقة واتجاه وزارة الزراعة نحو ترشيد استخدام المبيدات الكيمياوية والذي نتج عنه اتجاه كثيرا من المنتجين الي ما يسمي بالزراعة الحيوية للحصول علي منتجات زراعية نظيفة من التلوث بالمبيدات سواء للاستهلاك المحلي او بغرض التصدير مما شجع المستثمرين الي الدخول في تكنولوجيا انتاج المبيدات الحيوية (جدول٩-٤)

جدول رقم (٩ــ٤): المركبات الحيوية المستخدمة في مكافحة الافات والمنتجة في مصر

المركب	المسبب المرضي	الشركة المنتجة
البروتكتو	Bacillus thuringiensis kurstaki	وحدة المبيدات الحيوية–معهد بحوث وقاية النباتات
الاجرين	Bacillus thuringiensis Egypti	معهد الهندسة الوراثية–النصر للكيماويات الدوائية
بيوفار	Beauvaria bassiana	وحدة المبيدات الحيوية–معهد بحوث وقاية النباتات
بيوكانزا	Beauvaria bassiana	شركة كانزا
البيوفلاي	Beauvaria bassiana	شركة النصر للأسمدة والمنتجات الحيوية
البيوسكت	Beauvaria bassiana	كفر الزيات للأسمدة والكيماويات
بيورانزا	Metarihizium anisoplae	وحدة المبيدات الحيوية–معهد بحوث وقاية النباتات
فيروتكنو	فيروس فراشة درنات البطاطس	وحدة المبيدات الحيوية–معهد بحوث وقاية النباتات
فيروسيت	فيروس دودة ورق القطن	وحدة المبيدات الحيوية–معهد بحوث وقاية النباتات
البلانتا جاردا	Trichoderma spp	شركة النصر للأسمدة والمنتجات الحيوية
التريكو	Trichogramma	الشركة الدولية للزراعة الحيوية

جدول (٩ــ٥): الافات الرئيسية التي تستهدفها المكافحة الحيوية

الافة	المحصول	الافة	المحصول
دودة ورق القطن دودة اللوز القرنفلية	القطن	الحشرة القشرية الرخوة دودة القصب الكبيرة	القصب
فراشة درنات البطاطس	البطاطس	دودة ثمار العنب دودة ورق القطن	العنب
الخميرة – الافستيا – ابو دقيق الرمان	النخيل	صانعات الأنفاق	الموالح
العنكبوت الاحمر	الفراولة	آفات المخازن	الحبوب المخزونة

* الكائنات الممرضة المستخدمة في برنامج المكافحة الحيوية

البكتريا – الفيروسات – الفطريات .

جدول (٩ـ٦): استخدام المركبات الميكروبية لمكافحة الافات في مصر

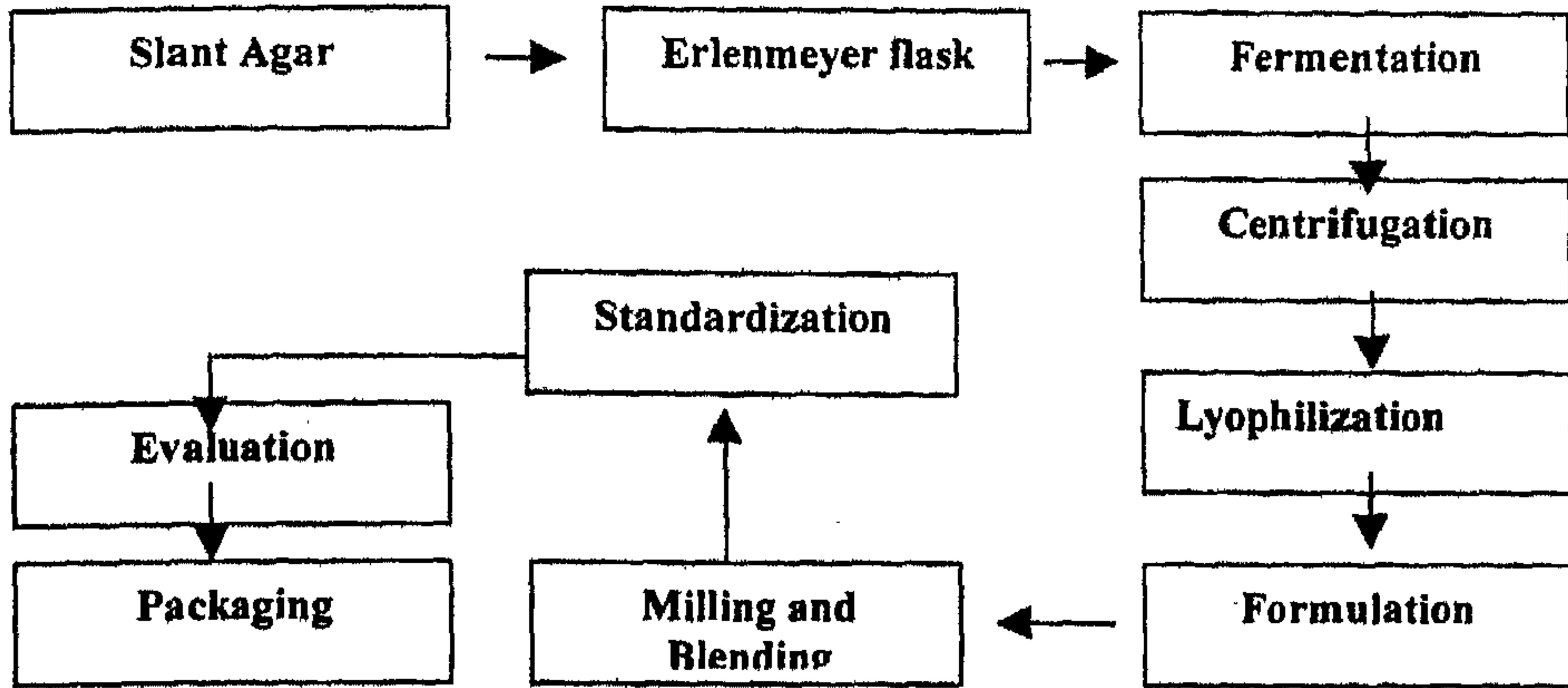
المركب الحيوي	الافة	المحصول	معدل الاستخدام
اجرين	دودة ورق القطن دودة ورق القطن	بنجر السكر القطن	٢٥٠ جرام للفدان ٥٠٠ جرام / فدان
بروتكتو	دودة ورق القطن دودة درنات البطاطس دودة البلح الصغري (الخميرة) دودة ثمار العنب	بنجر سكر – القطن بطاطس (حقل ومخزن) نخل عنب	٣٠٠ جرام / فدان ٣٠٠ جم/فدان ، ١٥٠ جم / طن ٦٠٠ جرام / فدان ٣٠٠ جرام/٤٠٠ لتر ماء
دايبل	دودة ورق القطن	قطن	٢٠٠ جرام / فدان
نيمكس	ذبابة البصل الكبيرة	بصل (مخزن)	٥٠٠ سم٣ / طن
بيوفلاي	الاكاروس الاحمر العادي	قطن-بطيخ-فاصوليا	٢٠٠سم٣/١٠٠ لترماء
فيرتيمك	الاكاروس الاحمر العادي	قطن – موالح	٤٠ سم٣/١٠٠ لتر ماء
ايكوتك – بيو	دودة ورق القطن	برسيم – بطاطس	٣٠٠ جرام / فدان
دايبل	دودة ورق القطن	برسيم	٢٠٠ جرام / فدان
نات – ١	الاكاروس الاحمر العادي	قطن – فراولة	١ لتر / ١٠٠ لتر ماء

* **المحاصيل التي تطبق فيها المكافحة الحيوية**

القطن – البطاطس – النخيل – قصب السكر – العنب – الفراولة – الموز – الموالح.

* **التقانات المستخدمة في انتاج المركبات الحيوية البكتيرية**

يوضح الشكل رقم (٩ـ٢) الخطوات المختلفة لانتاج بكتريا Bacillus thuringiensis kurstaki او المركب الحيوي "بروتكتو" حيث يعتمد نظام الانتاج علي عملية تخمر باستخدام مواد محلية من البيئة المصرية بحيث تكون رخيصة الثمن وتحتوي علي الاحتياجات الغذائية اللازمة لتكاثر ونمو وتجرثم البكتريا من الكربوهيدرات والبروتينات والفيتامينات والاملاح المعدنية. وتتشابة خطوات انتاج الفطريات في بعض المراحل ما عدا الاختلاف في البيئة المستخدمة.



شكل رقم (٩-٢): الخطوات المختلفة لانتاج مركب البروتكتو الذي يحتوي علي Bacillus thuringiensis kurstaki.

المحور الثالث: المشاكل والمعوقات التي تواجة استخدام المكافحة الحيوية في مصر

المعوقات الفنية:

١- نقص الخبرة عن الوسائل الحيوية

حتي الان معظم العاملين في مجال مكافحة الافات ليس لديهم المعرفة الكافية عن انسب الظروف للتعامل مع المنتج الحيوي من حيث توقيت الرش والالة المستخدمة في التطبيق وكذلك الطور الحساس من الافة المراد مكافحتها - عدم توفر الخبرة الكافية عن طبيعة العلاقة بين المسبب المرضي والافة مثل كيفية حدوث الفعل السام او الابادي علي الافة والتاثيرات الجانبية علي تطور الحشرات وما هي درجة تخصص المسبب المرضي من افة لاخري ، بالاضافة الي ذلك عدم معرفة العوامل البيئية التي تؤثر في فعالية المسبب المرضي ومدة بقائة تحت الظروف الحقلية - نقص المعلومات عن تاثير مكونات العائل النباتي المعامل الذي تتغذي علية المسبب المرضي ... عدم توفر تلك المعلومات لدي الباحث او المنهدس الزراعي بمكن ان يلعب دورا كبيرا في عدم نجاح المسبب المرضي في مكافحة الافة تحت الظروف الحقلية.

٢- درجة تخصص السلالات Lack of Specificity

من الاخطاء الشائعة الان في مجال المكافحة البيولوجية استخدام مركب واحد ضد اكثر من افة حشرية دون ملاحظة ان هناك درجة كبيرة من التخصص في فعالية تلك

المركبات فعلي سبيل المثال في حالة استخدام بكتريا الباسيلس Bacillus thuringiensis فان الاختلاف في تحت النوع Sub-species تعلب دورا هاما في الفعالية من افة لاخري وذلك للاختلاف في تركيب البللورات السامة التي تنتج بالبكتريا حيث ان هناك ثلاثة اقسام رئيسية للبلورات السامة هي Crystal I (Cry I) والتي تعتبر فعالة علي الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة Lepidoptera ، اما النوع الثاني Cry II فهو فعال ضد الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الاجنحة وثنائية الاجنحة ، والنوع الثالث CryIII فهو فعال ضد الحشرات غمدية الاجنحة Cloeoptera والنوع الرابع CryIV فهو فعال ضد الحشرات التابعة لرتبة ثنائية الاجنحة Diptera – هذا بالاضافة الي ان مكونات كل نوع من البللورات بما تحتوي من بروتين سام ودرجة توافق تلك البروتينات مع الفتحات الموجودة علي الشعيرات المبطنة للمعي الاوسط وكذلك درجة حموضة المعدة ودرجة نشاط انزيمات تحلل البروتين تلعب دورا في فعالية سلالة ما من البكتريا علي الحشرات المختلفة، ولذلك من الخطأ ان تستخدم سلالة فعالة ضد حشرات حرشفية الاجنحة ضد افات المخازن من السوس التابع لرتبة مدية الاجنحة او الاكاروس كما يحدث في بعض الدراسات التي تمت بواسطة غير المختصين حيث يكون التاثير في هذة الحالة راجع للاضافات الاخري في المركب وليس للبكتريا. بالنسبة للفطريات لابد من دزاسات موسعة لمعرفة درجة التخصص علي الحشرات المختلفة وان كانت ميكانيكية التاثير واحدة من خلال جدار الجسم حيث يتم الاختراق ثم الانتشار والتغذية والتكاثر علي محتويات الحشرة الداخلية.

٣ــ نوع المستحضر Type of Formulation

نوع المستحضر يلعب دورا اساسيا في درجة بقائة فعالا تحت ظروف التخزين فالمركبات البكتيرية التي تكون في صورة مساحيق قابلة للبلل تكون فترة بقائها تحت ظروف التخزين اطول من تلك التي تكون في صورة سائلة سواء في صورة مائية او زيتية حيث ان توفر الرطوبة يعمل علي نشاط المسبب المرضي باستمرار وفي بعض الاحيان تكون الصورة التي يوجد عليها المسبب المرضي غير ممرضة للافة كما حدث في مصر بالنسبة لاحد المستحضرات الفطرية والتي تحتوي علي فطر Beauvaria Bassiana حيث حقق هذا المركب خلال موسم ١٩٩٧ نتائج جيدة في مكافحة الذبابة البيضاء علي محصول القطن حيث كان المنتج حديثا مما دعا الشركة المنتج الي تجهيز كميات كبيرة لموسم ١٩٩٨ وخزنت لفترات تزيد علي ٦ اشهر ولكنها عند التطبيق لم تعطي أي كفاءة علي الذبابة البيضاء مما افقد ثقة الزراع في المنتج ، كما انه يكون من

الصـــعب تجهيز بعض المبيدات الحيوية في صورة مستحضرات تجارية كما هو الحال في حالـــة النيماتودا بالرغم من فعاليتها تحت الظروف المعملية ، بالنسبة للأعداء الحيوية من الطفيلـــيات والمفترســـات بالـــرغم من العديد من النجاحات التي تحققت في مصر باستخدام الطفيليات والمفترسات الا ان عملية انتاجها وتسويقها لازالت تواجهها بعض المشكلات مثل انـــتاجها بكمـــيات كبيرة وخاصة انها تحتاج الي تجهيزات مكلفة من مباني وبيئات لتربية عوائلهـــا المفضلة وجهد لاقناع المزارعين واوقات معينة للاطلاق بما يتناسب مع عوائلها من الحشرات حتي يمكنها من البقاء تحت الظروف الحقلية.

٤ـــ قصر فترة بقاء المركب Low Persistence

مـــن الخواص المميزة للكائنات الميكروبية من البكتريا والفطريات والفيروسات ان مـــدة بقائها في الحقل قصيرة بالمقارنة بالمبيدات وهذا يقلل من اقبال المزارعين عليها مما يتطلـــب برفع الوعي لدي الزراع عن ان تاثير هذة المركبات تراكمي فبالرغم من أن نسبة كبـــيرة منها تفقد خلال فترة وجيزة بعد الرش الا ان المتبقي من تلك الافراد له القدرة علي الـــتكاثر في الوسط المعامل او بنتيجة اعادة انتشارها من الافراد الحشرية التي اصيبت بها وهـــذة الظاهـــرة تسمي بظاهرة ال Epizitotic مما يساعد في احداث عدوي مرة اخري للحشيـــرات. كما ان مكونات المبيد الحيوي المضافة للمستحضر تلعب دورا في طول مدة بقائـــة وبخاصـــة المواد الواقية من الاشعة الفوق بنفسجية والتي تلعب دورا هاما في موت تلك الكائنات.

٥ـــ المدي العوائلي Host range

المدي العوائلي لمعظم المركبات الحيوية يعتبر محدود بالمقارنة بالمبيدات مما يجعل عملـــية المكافحـــة معقـــدة في بعض الاحيان وخاصة عند وجود اكثر من افة للمحصول ويتطلـــب الـــتدخل بالمبيدات لمكافحة تلك الافات بخلاف المبيدات حيث اعتاد الزراع علي استخدام مبيد واحد لمكافحة اكثر من افة في نفس الوقت.

٦ـــ تكاليف الانتاج في الدول النامية

يحتاج انتاج المركبات الحيوية سواء التي تحتوي علي كائنات ميكروبية او تلك التي تعـــتمد علي المركبات الحيوية الكيميائية الناتجة من تخمر الميكروبات الي تكنولوجيا عالية

للفصل والتعريف للنواتج المختلفة والتجهيز وبالتالي فهي تعتبر مكلفة في الكثير من الدول النامية.

٧ـ عدم وجود بروتوكولات مراقبة الجودة

عــدم توفــر الــبروتوكولات الخاصة بتقييم المركبات الحيوية مثل دراسة خواص البروتينات السامة في البكتريا او نواتج تمثيل الفطريات او تقدير جزيئات الفيروس وكذلك طرق اخذ العينات وكيفية حفظ المنتج النهائي وانسب الطرق في تقييم تلك المركبات معمليا وحقلــيا يجعل من الصعب تقارب النتائج المتحصل عليها في الاماكن المختلفة من محطات التقييم في المعامل والحقول.

المعوقات الاقتصادية:

تتمثل المعوقات الاقتصادية في عدم اقبال شركات انتاج المبيدات الكيماوية او رجال الاعمال علي الاهتمام بانتاج تلك المركبات لعدة اسباب اهمها تعود شركات انتاج المبيدات علــي تسويق الاف الاطنان من المبيدات سواء للسوق المحلي او التصدير مما يحقق ارباح طائلة من تلك العملية في فترات قصيرة ، ولكن نظرا لان المركبات الحيوية لازالت تحتاج الي مجهود كبير والنجاحات التي تحققت تعتبر ضئيلة بالنسبة للمبيدات فان معظم الشركات تعتبر الدخول في انتاج تلك المركبات عملية خاسرة.

المعوقات الطبيعية:

الظــروف البيئية تعتبر عوامل مؤثرة في نجاح استخدام تلك المركبات وخاصة التي تحتوي علي كائنات حية من البكتريا والفطريات والفيروسات مما يستلزم دائما البحث عن ســلالات مــن البيئة المحلية تتحمل الظروف البيئية السائدة والتغلب علي احتمالات ظهور صــفة المقارنــة لــتلك المركــبات مع تطوير صورة المنتج باستمرار حتي يمكن مقارنة الظروف البيئية المعاكسة.

المعوقات المؤسسية:

عــدم توفــر الدعــم المادي الكافي للتطوير المستمر في مجال بحوث التكنولوجيا الحيوية وخاصة ان الدراسات في هذا المجال تعتبر مكلفة.

المحـور الرابع: المقترح التطويري لاستخدام المكافحة الحيوية في الحد من تلوث البيئة في مصر

خلفية:

نظرا لان المبيدات الميكروبية اصبحت حجر الزاوية في برنامج المكافحة المتكاملة للافات لما لعناصر المكافحة البيولوجية المختلفة من تخصص تجاه عوائلها الحشرية وعدم اضـرارها بالحشـرات الـنافعة قد دفع بجذب الاهتمام اليها، حيث ان انماط مختلفة منها اسـتعملت لعديد من السنوات دونما ثمة تاثير بيئي غير مرغوب فيه، وذلك بالرغم من لك الحقـيقة والكم الهائل من البحوث المتعلقة بهذا المجال لم تاخذ المبيدات الميكروبية طريقها المنشـود الي السوق التجاري والذي يتناسب مع اهميتها وذلك بسبب قصر مدة بقائها تحت الظـروف الحقلـية وبطئ تاثيرها علي الافات مما يجعل الكثر من الزراع اكثر تخوفا من استخدامها مما يحتاج الي بذل المزيد من الجهود. للحصول علي افضل النتائج من استخدام المكافحة البيولوجية فمن الضروري توفر برامج متنوعة متكاملة integrated Diverse Programmes (IDP) تعـتمد علـي الاعـداء الطبيعية والكائنات الميكروبية (بكتريا – فطريات – فيروسات) بجانب الجاذبات الجنسية، ولتحقيق ذلك يلزم اتخاذ بعض الاجراءات التالية:

الاستراتيجية

يجـب الاخذ في الاعتبار ان استخدام الكائنات الميكروبية في مجال مكافحة الافات تعتـبر احـد انواع التكنولوجيا الموجهة واتي تعتمد علي ضرورة توفر الانتاج في اوقات محددة وبافضل صورة حتي يفي بالغرض المستخدم من اجلة وهذا يتطلب ما يلي:

١- الاهتمام بعلوم التكنولوجيا الحيوية biotechnology خاصة في مجالات البروتين والـتعديل الوراثـي genetic modification حيـث ان ذلك سوف يساعد في معـرفة الانواع المختلفة من البروتينات السامة لكل سلالة بكتيرية وبالتالي درجة فعاليـتها علـي الافـات المختلفة مع الاخذ في الاعتبار درجة حساسية الاطوار المخـتلفة للافات وكذلك تاثير العائل النباتي الذي تتغذي علية الحشرة علي فعالية البكـتريا ، كمـا ان الـتعديل الوراثـي سوف يساعد في زيادة فعالية السلالات البكتيرية من خلال ادخال اكثر من جين وبالتالي تستطيع السلالة الواحدة ان تنتج اكثر من توكسين ذو فعالية علي اكثر من افة. وفي حالة الفيروسات يمكن تحسين مدة بقاء الفيروس تحت الظروف الحقلية مع زيادة فعاليتة من خلال ادخال بعض

الجينات الوراثية من الكائنات الاخري مثل الجينات المؤلة عن افراز المواد السامة في العقرب او النحل او بعض انواع الدبابير.

٢- تطوير البحوث العلمية في مجال الميكروبيولوجي من حيث البحث المستمر عن الكائنات الميكروبية (بكتريا – فطريات – الفيروسات) الممرضة للافات علي مستوي القطر الواحد وبالتالي عمل خريطة جغرافية لتلك المسببات حتي يمكن توفر المعلومات الاولية عن امكانية نجاحها في كل منطقة طبقا للظروف المناخية السائدة والتي تختلف فيها الافات الحشرية بناءا علي اختلاف العوائل المنتشرة بها. كما أن هذا الحصر الجغرافي للمسببات المرضية يمكن ان يساعد علي معرفة الكائنات المنتشرة علي مستوي الوطن العربي لمعرفة مدي امكانية تبادلها واستخدامها في اكثر من دولة بالوطن العربي لمكافحة الافات المتشابهة في تلك الدول.

٣- زيادة الميزانيات الخاصة بتطوير البحوث العلمية التطبيقية في مجال المكافحة الحيوية للافات وتبني المنظمة العربية للتنمية الزراعية فكرة انشاء رابطة العاملين في مجال المكافحة البيولوجية مما يمكنهم من التبادل المستمر للمعلومات والبحوث حتي يمكن توحيد طرق تسجيل وتداول ومراقبة الجودة للمركبات الحيوية حتي يمكن تجنب ما يستجد من مشكلات قد تنجم عنها علي المدي البعيد مثل ظهور صفة مقاومة الافات لتلك المركبات.

٤- ضرورة تعاون الباحثين في التخصصات المختلفة مثل مكافحة الافات والحشرات والامراض والميكروبيولوجيا الزراعية والتكنولوجيا الحيوية لان ذلك سوف يساعد في معرفة درجة تخصص المسببات المرضية وميكانيكية احداث الفعل السام لها علي الحشرات وكذلك درجة تحملها للظروف البيئية المختلفة وبالتالي العمل علي تحسين صورة المنتج التجاري بما يحقق افضل النتائج علي المستوي التطبيقي.

٥- تنشيط دور القطاع الخاص والاستثمار في عملية انتاج المركبات الحيوية بصورها المختلفة مثل انتاج بكتريا الباسيلس بما يخدم الدول العربية في ظل سياسة التجارة الحرة وانشاء السوق العربية المشتركة.

الاهتمام بالتدريب المستمر للمهندسين لزيادة مفهوم المكافحة الحيوية وكيفية العمل علي انجاحها وظروف التطبيق الامثل وربط ذلك بكلا من سلوك وبيولوجية

REFERENCES

Abdella, M.M.H. (1976). Biological control on certain natural enemies attacking of some stored product pest insets. Entomophagous insects attacking Anagasta kuihniella Zeiler in Alexandria mills and silos with particular refemce to the morphological, biological and ecological aspects of Allaeocrafwm bianmiipes (Montrouzier and Signoret) under laboratory conditions. M.Sc., Thesis. Fac. Agric. Alexandria, Univ.

Abdella, M.M.H. (1981). Natural enemies of major stored product pests, with (reuter) (Anthocoridae) and Allaeocranum bianrnlipes (Montrouzier et Signoret) (Teduviidae). Ph.D., Thesis. Fac Agric. Cairo. Univ., 212 pp. Abd El-Hafez, Alia (1995). A comparison of thermal requirements and some biological aspects of Trichogramma evanescence Westwood and Trichogramma bactrae Nagagja from egg of pink and spiny bollworms. Agric. Sci., A in Shams Univ., Cairo, 40:901-912.

Abd El-Hafez, Alia and M.A. Nada (2000). Augmentation of Trichogrammatouidea bactrae Nagaraia in the IPM programme for control of pink bollworm, Pectinophora gossypiella (Saund.) in Egypt. In Proceedings Beltwide Cotton Conference at San Antonio, TX, America; January, 4-8, pp. 1009-1014.

Arafa, M. (2002). Personal communication

Bekheit, H.K.; Alia Abd El-Hafez; Suzan H. Tahcr and Moawad, G.M. (1995):Potency of Some New Isolates of Bacillus thuringiensis Against the Pink and Spiny Bollworms. Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ,, Cairo, 40:411-416.

Bekheit, H.K.M f/PPP/'Production technology of Bacillus thuringiensis and granulosis virus for the control of certain economic pests in Egypt Adv. Agric. Res. Egypt, 2 (2): 136-187. Bekheit, H.K.M. ; A.M. Mabrouk; S. Abd El-Haleem

and R. El-Bedewy (2000): Using of Bacillus thuringiensis and Granulosis Virus for Control of Potato Tuber Moth, Phthorimaea operculella (Zeiler) in Egypt, African Potato Association, Conference Proceedings, Vol., 5:243-249. Benbrook, C.M. (1996). Pest Management at the Crossroads Consumer Union, Yonkers, new York.

Brown, L.M.; Gibson, A.; Evert, R.; Cantor, G.D.; Schumann, K.P.; Burmeister, L.M.; Van Lier, L.F. and Dick, F. (1990). Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota, Cancer Research, 50:6585-6591. Cantor, K.P., Blair, A.; Everett, G.; Gibson, R.; Burmeister, L.F.; Brown, L.M.;

Schumann, L. and Dick, F.R. (1992). Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota, Cancer Research, 52:2447-2455.

El-Amaouty, S-A,; Nevien, Gaber and Tawfik, M.F.S- (2000*). Biological control of the green peach aphid, Myzus persicae by Chrysoperia carnea (Stephens) Sensulato (Neuroptera:Chrysopidae) on green pepper in greenhouses in Egypt Egypt. J. Biol. Pest. Control, 10:109-121.

El-Arnaouty, S-A.; Beyssat-Amaouty, V.; Ferran, A. and Galal, K (2000b). Introduction and release of the coccinellid, Harmonia axyridis Pallas for controlling Aphis craccivora koch on faba beans in Egypt. Egypt. J. Biol. Pest. Control, 10:129-136.

El-Husseini, M.M.; Schumann , K. and Sermann, H. (1993). Rearing immature feeding stage of Or ins majesculus reut. (Heteroptera: Anthocoridae) on the acarid mite, Tyrophagus puntriscentiae Schr. As new alternative prey. El-Husseini, M.M.; Agamy, E.A.; Bekheit, H.K. and Naglaa A.M. Omar (2000): Efficacy of three Bacillus thuringiensis Berliner soil isolates against young larvae o!Spodoptera Uttoralis (Boisd.) on two host plants. Egyptian J. Biol. Pest Control 10 (2): 103-107. El-Husseini. M.M.: Agamy, E.A.; Bekheit, H.K. and Naglaa A.M. Omar (2000): 13 against the cotton leaf worm,

Spodoptera littoralis (Boisd.)., Egyptian J. Biol. Pest Control.^ (2):97-10L

El-Sebae, A.H. (1989). Fate and undesirable effects of pesticides in Egypt. Ecotoxicology and Climate, SCOPE, 38:359-371.

FAO (1994) 1993 production yearbook Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fayad, Y.H.; Hafez , M. and El-Kifl, A.H. (1979). Survey of the natural enemies of the three corn borers, Sesamia cretica Led., Chilo Agamemnon Bles. And Ostrinia nubilalis Hbn in Egypt. Agric. Res. Rev. Cairo, 67:29-32.

Georghiou, G.P. (1986). The Magnitude of Resistance Problem. Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management National Academy of science, Washington, DC, pp. 18-41.

Grue, C.E.; Fleming, W.J.; Busby, D.G. and Hill, E.F. (1983). Assessing hazards of organophosphate pesticides to wildlife. Trans, N, Aft Wildt, nat. res. Conf. 48:200-220.

Hamed, A.R.; Reckhaus, P.M.; Mahrous, F.n.; Soliman, N.Z. and Gassert, W.A. (998). Successful biological control program for the control the citrus leafminer, Phyllocnistis citrella Staintin (Lepidoptera:Garcillariidae) in Egypt. Proceeding of the first regional Symposium for Applied Biological Control in Meditrrenean Countries, Cairo University, October, 1998, pp. 139-146.

Hudson, r.h.; Tucker, R.K. and Haegele, M.A. (1984). Handbook of toxicity of pesticides to wildlife, U.S. fish Wildl. Sen Resource Publ., No. 153.

LeBaron, H.M. and McFarland, J. (1990). Herbicide resistance in weeds and crops. In Green, M.B., LeBaron, H.M. and Moberg, W.K. 9Eds.) managing Resistance from fundamental research to Practical Strategies. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 336-352.

Moawad, G.M.; Comma, M.B.; Ashour, M.B. and Bekheit, H.K.M. (1994): Mating Disruption Trials for the Control of Pink Bollworm, Pectinophora gossypiella (Saund.). 5th Conf. Agric. Dev. Res., Fac. Agric., Am Shams Univ., Cairo, Egypt, 2,1079-1094.

Moawad, G.M.; E.A. Gomma; Ashour, M.B. and Bekheit. H.K.M (1994): Integrated Use of Pheromone and Conventional Insecticides Against Pink Bollworm. 5th Conf. Agric. Dev. Res., Fac. Agric., A in Shams Univ., Cairo, Egypt, 2,1025-1044.

Moawad, G.M.; El-Bedawy; R.A; Bekheit, H.K.M. and Lagnaui, A. (1997):
Biological Control of the Potato Tuber Moth, Phthorimaea operculella (ZeUer) in Potato fields and Storage. Agric. Res. Review, Plant Protection . 75(4):923-938.

Pimentel, D.; Acquay, H. and Biltonen, M. (1993). Assesment of environmental and economic impacts of pesticide use. In the Pesticide Question. Environment. Economics and Ethles, (eds. D. Pimentel and H. Lehman), Chapman & Hall, New York. Pp-47-84.

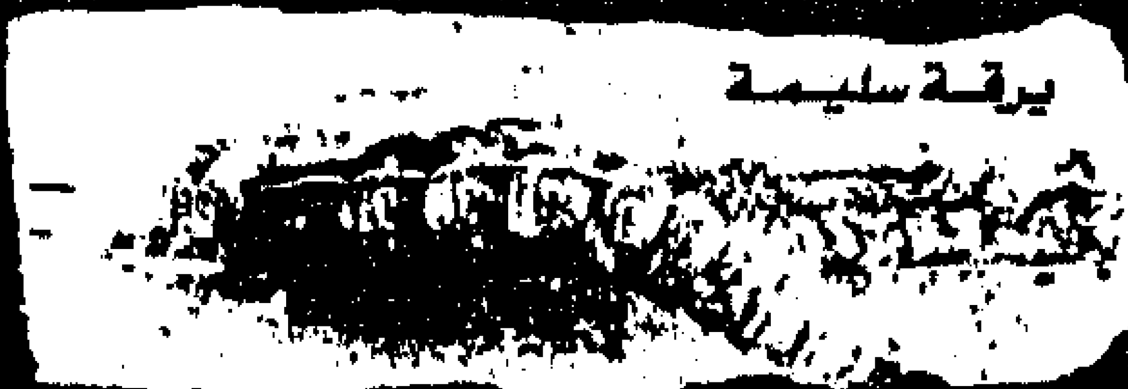
UNEP (1991). Enviromental data report. Blackwil, Oxford.

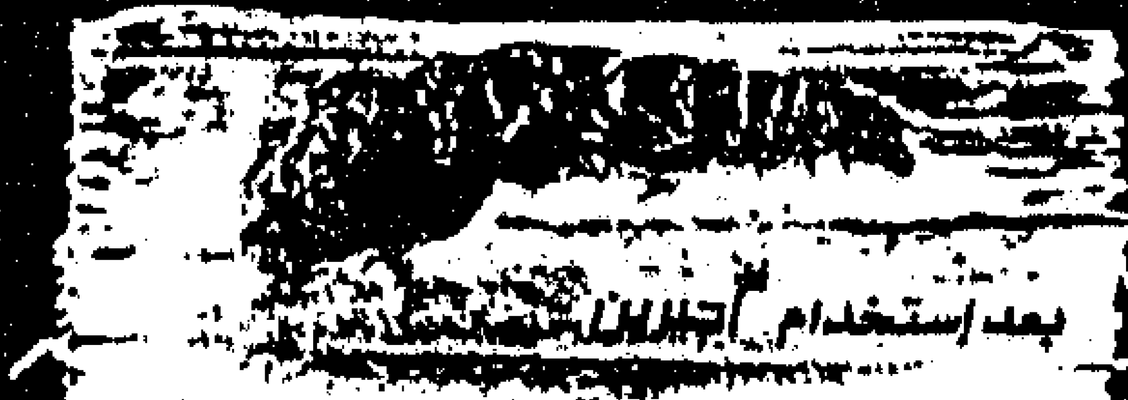
WHO/UNEP (1989). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture, Worled Health Organization/United National Environmental Programme, Geneva.



كيف يقضى أجيرين على الحشرات

عند تغذية اليرقات على أجزاء النبات المعامل بمركب أجيرين يتم تفاعل بين مادة أجيرين ومستقبلات متخصصة على الغشاء المبطن للقناة الهضمية الوسطى لليرقة حيث تبدأ سلسلة من التفاعلات البيوكيماوية ينتج عنها احداث ثقوب بالجدار المبطن للقناة الهضمية مما يؤدى الى خلل فى النظام الأيونى للحشرة وتتوقف اليرقة عن التغذية ثم تموت خلال يوم أو يومين على الاكثر.





إرشادات الاستعمال

- قبل استعمال يجب التأكد من نظافة الرشاشة من آثار أى مبيد كيماوى آخر.
- تضاف الكمية الموصى بها من على نصف كمية المياه الموصى بها وتقلب جيدا داخل الرشاشة ثم يضاف باقى كمية المياه بالكامل.
- فى حالة عدم وجود مقلب اوماتيكى يراعى رج الرشاشة أو التقليب على فترات وجيزة لضمان تجانس مع المياه.
- يجب أن يغطى محلول الرش الأسطح العلوية والسفلية لأوراق النباتات المعالجة ويجب أن يتم الرش إما فى الصباح الباكر أو المساء لتقليل تأثير أشعة الشمس المباشرة على حيوية أجيرين.

ملاحظات عامة

- يخزن أجيرين فى مكان جيد التهوية بعيدا عن ضوء الشمس ومعتدل الحرارة (أقل من ٣٥ م).
- يجب مراعاة الطرق المشروعة للتخلص من العبوات الفارغة.

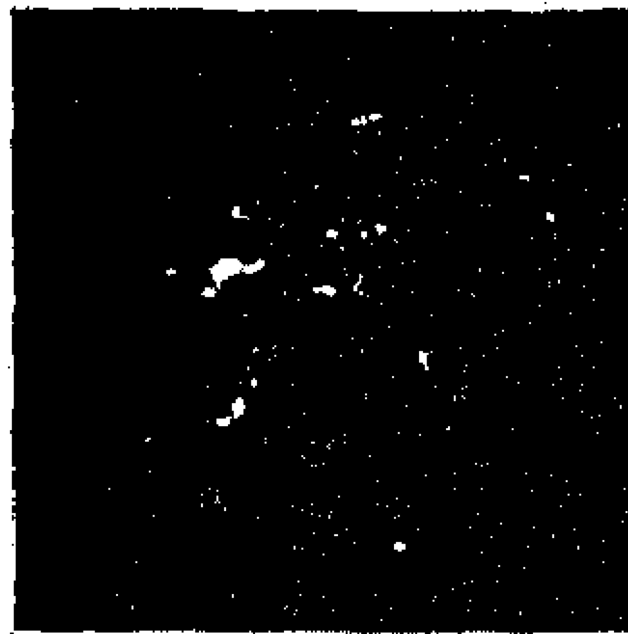
إستخدامات أجيرين®

• دودة فراشة درنات البطاطس.

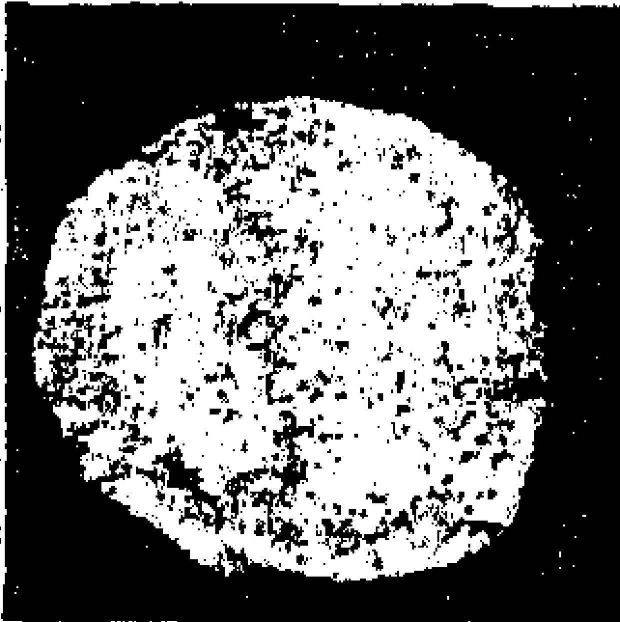
- في الحقل، عند ظهور الفقس الحديث يتم الرش بمعدل ٢٠٠ جرام أجيرين للفدان تذاب فى ٢٠٠ لتر ماء.
- فى النوالات والمراود، بعد التخلص من الدرنات المصابة يستخدم ١٥٠ جرام من أجيرين لكل طن بطاطس تعفيرا على الدرنات.

• دودة ورق القطن وديدان اللوز.

- فور ظهور الفقس الحديث يتم رش أجيرين بمعدل ٢٥٠ جرام فى ٢٠٠ لتر ماء للفدان مع مراعاة رش المجموع الخضرى جيدا وتكرار الرش كل عشرة أيام أو عند ظهور الفقس الحديث.




درنات بطاطس مصابة بيرقات فراشة درنات البطاطس

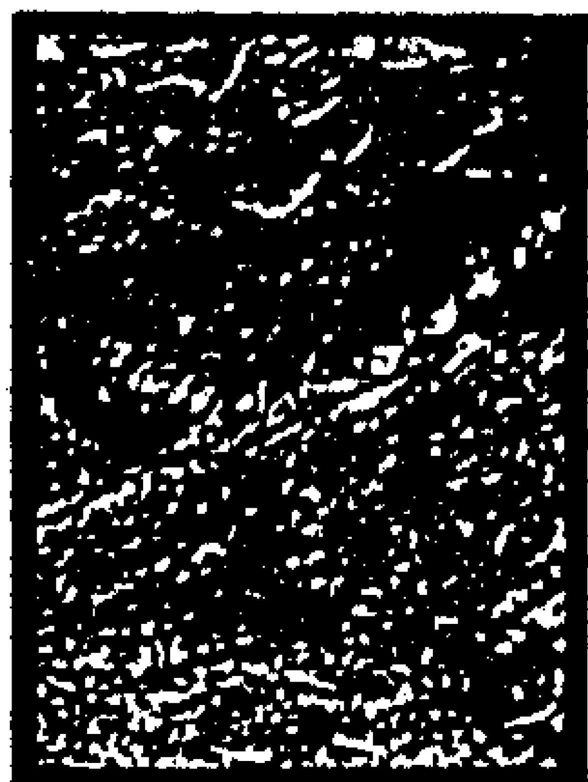


- ينصح باتخاذ الاحتياطات الخاصة بالأمان العام للقائمين على رش هذا المبيد الحيوى مثل غسيل اليدين بعد الرش.

المدى الواسع لإستخدام أجيرين®

يستخدم أجيرين بمعدل
٢٥٠جم/٢٠٠لتر للفدان



القطن
دودة ورق القطن
دودة اللوز القرنفلية
دودة اللوز الأمريكية
الدودة القارضة

البرسيم
دودة ورق القطن

الذرة
الدودة القارضة
الثاقبات
دودة ورق القطن

البطاطس
فراشة درنات البطاطس
دودة ورق القطن
الدودة القارضة

الطماطم - الفلفل - الباذنجان
دودة ورق القطن
الدودة القارضة
دودة ثمار الطماطم

اللوبيا
دودة ورق اللوبيا

الفاصوليا
دودة ورق القطن

الكرنب
دودة ورق القطن

البطيخ
ديدان البطيخ
الخنفساء الحمراء

الزيتون
دودة أوراق الزيتون الخضراء

الخضروات الخضراء
دودة ورق القطن
حرشفيات الأجنحة الأخرى

القصب
دودة القصب الكبيرة
ثاقبات الذرة

بنجر السكر
دودة ورق القطن

الموالح
دودة أزهار الموالح

عباد الشمس
الدودة القارضة
دودة ورق القطن

العنب
دودة ثمار العنب



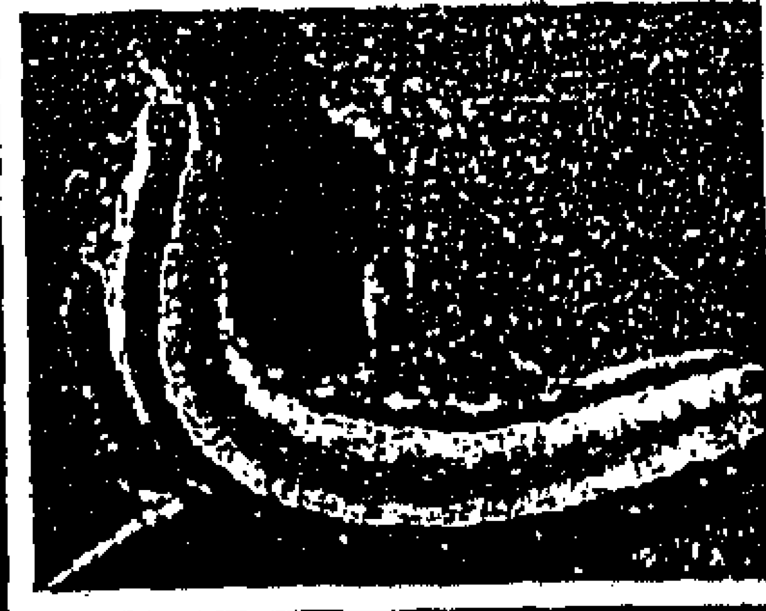







* أجيرين®
صديق للبيئة وغير ضار بالإنسان أو الحيوان ولا يؤثر على الأعداء الطبيعية أو الحشرات النافعة.

* أجيرين®
مركب حيوى فعال لمقاومة العديد من الآفات الزراعية من رتبة حرشفية الأجنحة.







* أجيرين®
يحتوى على مادة فعالة عبارة عن باسيليس ثيرنجينسيس كل ملليجرام يحتوى على ٣٢٠٠٠ وحدة دولية من المادة الفعالة.





* أجيرين®
يمكن تناول المحصول فى نفس يوم رش المركب ويؤدى ذلك إلى حماية النباتات وحصول المزارع على أكبر عائد إقتصادى.

* أجيرين® مسجل برقم ٥٨٠ لسنة ١٩٩٧ وموصى به من وزارة الزراعة والمركز الدولى للبطاطس.

Patent No. 019797

براءة إختراع رقم ٠١٩٧٩٧

BIOGRO INTERNATIONAL - EGYPT
46 Mohey Eldin Aboul Ezz - Dokki - Giza - Egypt
Tel: 3367880

Under license from: Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI) - ARC - Giza - Egypt.

Registration No.: 580/1997

انتاج شركة بيوجرو إنترناشيونال مصر
٤٦ شارع محى الدين أبو العز - الدقى - الجيزة
ت: ٣٣٦٧٨٨٠

بتصريح من معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية
مركز البحوث الزراعية - وزارة الزراعة



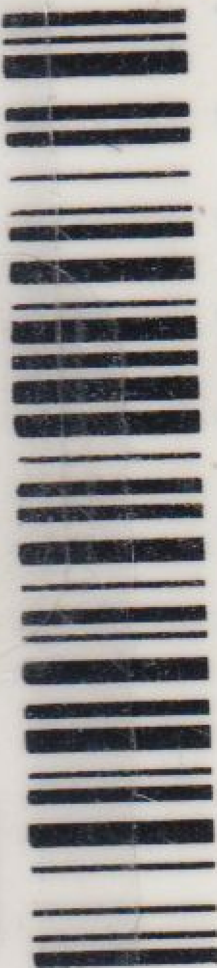


أ.د. زيدان هندي عبدالحميد

- بكالوريوس العلوم الزراعية "حشرات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٣ .
- ماجستير العلوم الزراعية "كيمياء مبيدات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٦ .
- دكتوراه فلسفة العلوم الزراعية "مبيدات الآفات" كلية الزراعة - جامعة عين شمس ١٩٦٩ .
- مدرس في علوم وقاية النبات ١٩٦٩ - ١٩٧٤ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- أستاذ مساعد في علوم وقاية النبات ١٩٧٤ - ١٩٧٩ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- أستاذ في علوم وقاية النبات ١٩٧٩ وحتى الآن بكلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- وكيل كلية الزراعة - جامعة عين شمس لشئون الدراسات العليا ١٩٩٢ - ١٩٩٨ .
- مستشار علمي لشركة سوميتومو كيميكل اليابانية للمبيدات منذ ١٩٧٨ وحتى الآن في مصر والدول العربية .
- المشاركة في معظم المؤتمرات المحلية والعالمية في مجالات وقاية النبات - كيمياء المبيدات - المكافحة المتكاملة للآفات - المشاكل الخاصة بالتلوث البيئي .
- المشاركة في العديد من الدورات الخاصة بالتوعية بمخاطر المبيدات والملوثات البيئية الأخرى في مصر والدول العربية الأخرى .
- الأشتراك في المشروعات القومية الخاصة بالمكافحة المستنيرة للآفات والتلوث البيئي والمكافحة الحيوية للآفات .
- عضو في العديد من الجمعيات العلمية في مجالات وقاية النبات والبيولوجية الجزيئية وكيمياء المبيدات والتوكسيكولوجي والمبيدات والتلوث البيئي .

بعض مما نشر لـ أ.د. زيدان هندي :

(١) الاتجاهات الحديثة المبيدات ومكافحة الحشرات ٢ج . ١٩٩٥
(٢) الآفات الحشرية والحيوانية . ١٩٩٥
(٣) الملوثات الكيميائية والبيئية . ١٩٩٦
(٤) التسمم الغذائي والملوثات الكيماوية . ١٩٩٩
(٥) أساسيات وطرق تحليل مبيدات الآفات . ١٩٩٩
(٦) انقلاب الجنس وفقد المناعة بين المبيدات والهرمونات . ١٩٩٩
(٧) السمية البيئية والتفاعلات الحيوية للكيمائيات والمبيدات . ٢٠٠٠
(٨) المكافحة المستنيرة للأمراض النباتية . ٢٠٠٠
(٩) فساد الأرض وتدمير الإنسان . ٢٠٠٠
(١٠) هموم الإنسان والبيئة . ٢٠٠٠
(١١) الأمراض الفطرية ومكافحة الأمراض النباتية . [illegible]
(١٢) الموارد المائية والاتساخ بالمبيدات . [illegible]
(١٣) ترشيد المبيدات في مكافحة الآفات . [illegible]
(١٤) التكنولوجيا الحيوية والجزيئية في مجابهة الآفات الزراعية والأجهادات البيئية . [illegible]
(١٥) مخاطر المبيدات على الصحة العامة والبيئة . [illegible]
(١٦) السموم النباتية ومكافحة الآفات . [illegible]
(١٧) نسخ وتقليد مبيدات الآفات (القبول - الرفض - التشريع) . [illegible]
(١٨) وبائية التعرض المزمن للمبيدات بين الصحة العامة والبيئة . [illegible]



كانزا جروب

